

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**ELIMINACIÓN DEL GEN MARCADOR DE SELECCIÓN EN PLANTAS
TRANSPLASTÓMICAS MEDIANTE LA EXPRESIÓN TRANSITORIA DE LA
RECOMBINASA CRE**

presentado por

NAHIKARI LÓPEZ LÓPEZ

aurkeztua

**INGENIERO TÉCNICO AGRÍCOLA EN HORTOFRUTICULTURA Y JARDINERÍA
*NEKAZARITZAKO INGENIARI TEKNIKO BARATZEZAINZA, FRUTAGINTZA ETA
LOREZAINZA BEREZITASUNA***

Noviembre, 2011

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**ELIMINACIÓN DEL GEN MARCADOR DE SELECCIÓN EN PLANTAS
TRANSPLASTÓMICAS MEDIANTE LA EXPRESIÓN TRANSITORIA DE LA
RECOMBINASA CRE**

presentado por

NAHIKARI LÓPEZ LÓPEZ

aurkeztua

INGENIERO TÉCNICO AGRÍCOLA EN HORTOFRUTICULTURA Y JARDINERÍA
*NEKAZARITZAKO INGENIARI TEKNIKO BARATZEZAINZA, FRUTAGINTZA ETA
LOREZAINZA BEREZITASUNA*

Noviembre, 2011

Resumen

La formación de plantas transgénicas o transplastómicas requiere de la incorporación al genoma, ya sea al nuclear o al plastidial, del gen de interés acompañado de un gen marcador de selección que, generalmente, confiere resistencia a un antibiótico.

Una vez que se ha obtenido la planta transgénica o transplastómica, es aconsejable eliminar el gen marcador de selección de la planta debido a la carga genética que supone para las células pero sobre todo al riesgo para la salud humana y animal que implica la posible incorporación de este gen de resistencia a un antibiótico a bacterias patógenas pues puede disminuir la eficacia de los antibióticos.

En este trabajo se utilizaron dos variedades transplastómicas de *Nicotiana tabacum* (tabaco). Estas variedades son: "Virginia Gold" y "Havana 503-B". Llevan incorporados el gen "tiorredoxina" ("TRX") y el gen marcador *aadA* que confiere resistencia al antibiótico espectinomicina y estreptomicina.

Se propone un método para la eliminación de este gen marcador que consiste en la expresión transitoria de la recombinasa CRE la cual reconoce las secuencias *lox* flanqueadoras del gen *aadA* y suprime el fragmento de ADN que está en medio de estas dos secuencias.

Se utilizó la agroinfiltración como método para incorporar la recombinasa CRE en el interior del tejido vegetal y que ésta se exprese de forma transitoria, sin introducirse en el núcleo celular. Se probaron cuatro condiciones diferentes variando la presión de vacío (2 Torr ó 10 Torr) y el tiempo que *Agrobacterium* estuvo en contacto con los explantos vegetales después de la agroinfiltración (2 ó 4 días). Las plantas obtenidas tras la agroinfiltración se analizaron mediante PCR para chequear la presencia del *aadA* y las negativas para este gen se analizaron mediante Southern blot. Además, paralelamente se colocaron fragmentos de hoja de las plantas que salieron negativas para la PCR en un medio de cultivo que contenía espectinomicina para comprobar la sensibilidad/resistencia a dicho antibiótico.

Aunque algunas de las plantas salieron negativas en la PCR y presentaron sensibilidad a la espectinomicina, el Southern blot confirmó que todas ellas eran portadoras del gen marcador de selección *aadA*.

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a mi tutor Jon Veramendi por ayudarme a entender que la biotecnología es un camino apasionante que merece la pena conocer, gracias por la ayuda que me has prestado en todo este tiempo.

Agradezco igualmente a Inma Farrán y Alicia Fernández por toda vuestra ayuda y por enseñarme los métodos y procedimientos que debía seguir. Gracias por las veces en las que me habéis ayudado a entender todas aquellas cosas que no comprendía.

A Luis Larraya por preocuparte por cómo estaban saliendo mis experimentos, por ser tan atento, por enseñarme a hacer bien una PCR, por tu paciencia y tu apoyo.

A los chicos de la cocina, a María, Miriam y Óscar, por ayudarme y apoyarme. A Mari Jose por cuidar de mis plantas con tanto esmero y tanta paciencia. Por enseñarme con ilusión a hacer cosas que no sabía.

A Víctor, por toda tu ayuda cuando la he necesitado.

A mis compañeros de clase, especialmente a Marcos e Izaskun, por todo el apoyo que me han dado en este tiempo y por animarme en todo momento.

A Ander y Sara, porque vuestros ánimos me han ayudado mucho y me han ayudado a seguir adelante.

A mi familia, que me ha apoyado en todo. Gracias por vuestra paciencia, por vuestros ánimos porque habéis estado siempre ahí cuando más lo necesitaba.

Y en general, a todo el L3 y a todas aquellas personas que me han apoyado y que han creído en mí. Gracias.

Índice general

1. Introducción.....	1
1.1. Transformación plastidial	1
1.2. Genes marcadores de selección: importancia y tipos.....	3
1.3. Sistemas de eliminación de genes marcadores	6
1.4. Métodos utilizados para introducir la recombinasa CRE	11
2. Objetivos	15
3. Materiales y métodos	17
3.1. Material.....	17
3.1.1. Material vegetal.....	17
3.1.2. Medios de cultivo.....	17
3.1.3. Vector de transformación.....	18
3.2. Métodos	19
3.2.1. Desinfección de semillas y siembra	19
3.2.2. Individualización de plántulas	20
3.2.3. Preparación del <i>Agrobacterium</i> para la agroinfiltración.....	21
3.2.4. Agroinfiltración.....	23
3.2.5. Subcultivo de los explantos a medio RMOP+ Cefotaxima	28
3.2.6. Subcultivo de brotes a medio de enraizamiento	28
3.2.7. Trasplante a Jiffy	29
3.2.8. Extracción de ADN. Método CTAB	30
3.2.9. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa	32
3.2.10. Gel de agarosa y electroforesis.....	35
3.2.11. Trasplante y prueba de espectinomicina	36
3.2.12. Southern Blot	38

4. Resultados y discusión	41
4.1. Regeneración de plantas tras el proceso de agroinfiltración	41
4.2. Chequeo de la presencia del gen <i>aadA</i> mediante PCR.....	42
4.3. Sensibilidad a espectinomicina de las plantas trasplantadas	49
4.4. Southern blot de las plantas PCR negativo para el gen <i>aadA</i>	50
5. Conclusiones	55
6. Bibliografía	57

Índice de figuras

Figura nº

1. Genoma plastidial de tabaco.....	2
2. Vector de transformación del genoma plastidial de tabaco	18
3. Individualización de plántulas de tabaco	20
4. Montaje realizado para la agroinfiltración.....	26
5. Detalle de los recipientes con los fragmentos de hoja suspendidos sobre el medio de <i>Agrobacterium</i> antes de realizarse la agroinfiltración	26
6. Detalle de un brote fruto de la organogénesis en medio RMOP	28
7. Ciclo de temperaturas de PCR para el gen tiorredoxina	34
8. Ciclo de temperaturas de PCR para <i>aadA</i>	34
9. Ciclo de temperaturas de PCR para comprobar si se ha incorporado el gen <i>cre</i> al genoma	35
10. Montaje para la transferencia del ADN desde el gel hasta la membrana.....	39
11. Plantas desarrollándose en el invernadero.....	42
12. Chequeo de ADN mediante PCR para comprobar la presencia/ausencia del <i>aadA</i> en la variedad 503-B	44
13. Chequeo de ADN mediante PCR para comprobar la presencia/ausencia del <i>aadA</i> en la variedad Virginia Gold	46
14. Chequeo de ADN mediante PCR para comprobar la presencia/ausencia de la tiorredoxina en las plantas negativas para el <i>aadA</i>	47

15. Chequeo de ADN mediante PCR para comprobar la no incorporación de la recombinasa CRE al núcleo celular en las plantas negativas para el <i>aadA</i>	48
16. Aspecto de explantos resistentes/sensibles a espectinomicina.....	50
17. Digestión del ADN de las muestras negativas para el <i>aadA</i>	51
18. Southern blot con la sonda SH	52
19. Southern blot con la sonda específica para el <i>aadA</i>	52

Índice de tablas

Tabla nº

1. Abreviaturas de las variedades de tabaco empleadas	17
2. Condiciones de agroinfiltración y cocultivo con <i>Agrobacterium</i>	27
3. Cebadores utilizados en las PCR, su secuencia, el fragmento que amplifican y el tamaño de la secuencia amplificada	33
4. Número de regenerantes que se obtuvieron de cada variedad tras el proceso de agroinfiltración.....	41
5. Número de plantas analizadas de cada condición y el número de muestras sin banda del gen <i>aadA</i> en cada una de ellas de la variedad 503-B	43
6. Número de plantas analizadas de cada condición y el número de muestras sin banda del gen <i>aadA</i> en cada una de ellas de la variedad Virginia Gold.....	45
7. Plantas de cada variedad negativas para el <i>aadA</i> por PCR	48
8. Plantas sensibles a espectinomicina	49

1.- Introducción

1.1.- Transformación plastidial

Según la teoría endosimbiótica propuesta por Lynn Margulis en 1970, los cloroplastos y las mitocondrias eran células procariotas que en un momento dado se incorporaron al interior de la célula primitiva estableciéndose entonces una relación endosimbiótica ya que, de esta manera, la nueva célula conocida con el nombre de eucariota, podría pasar de un estado anaerobio a un estado aerobio y, además, podría utilizar como fuente de carbono el CO₂ y convertirse en un organismo autótrofo (Margulis, 1967).

Así pues, los plastidios son orgánulos celulares semiautónomos con su propio ADN y mecanismo de transcripción-traducción conservando sus características procariotas.

El genoma plastidial es una molécula circular de doble cadena de ADN con un tamaño de entre 120-160 Kb que codifican, aproximadamente, 120 genes.

Los proplastidios son los precursores de todos los demás tipos de plastidios como cloroplastos, amiloplastos o cromoplastos. (Kirk et al, 1967).

La importancia de los plastidios desde el punto de vista de la biotecnología radica en el hecho del gran número de copias de genoma plastidial que hay en ellos. Una célula del mesófilo de la hoja contiene alrededor de 100 cloroplastos en cada uno de los cuales hay entre 10 y 14 nucleosomas (varias moléculas de ADN plastidial unidas y asociadas a las membranas) por lo que en cada célula habrá unas 10.000 copias de ADN plastidial o ptDNA en guisante y hasta 50,000 copias en una célula de trigo (Bock, 2001). Dado el alto número de copia del transgén, los niveles de expresión génica en los cloroplastos son muy altos, de hasta el 70% de la proteína soluble total (Oey et al, 2009).

Todas las plantas transgénicas comercializadas están transformadas en el genoma nuclear pero en la actualidad está habiendo cada vez más una tendencia al estudio de plantas transplastómicas, es decir, plantas que en lugar de tener modificado genéticamente el núcleo lo que se modifica es el ADN plastidial debido a las ventajas que plantea. Además, cabe decir que en la mayoría de las especies de interés agronómico, los cloroplastos y mitocondrias

se heredan únicamente del parental materno, con lo que si se transforma el genoma plastidial en lugar del nuclear, se evita la transmisión de genes mediante polen (Birky, W. 2001).

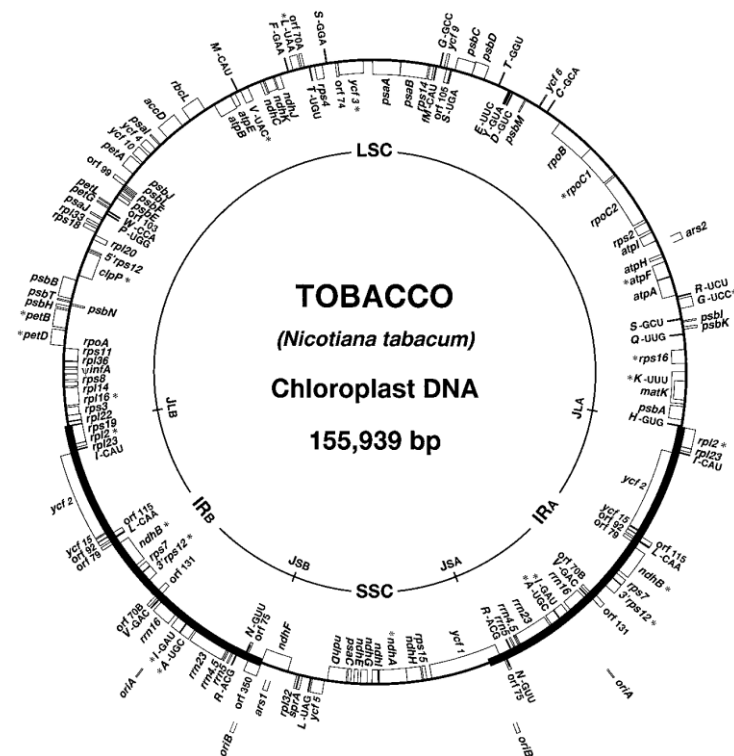


Figura 1: Genoma plastidial de tabaco. Según Wakasugi et al, 1998.

El método de transformación plastidial que más se utiliza es el denominado sistema biolístico (Sanford et al. 1991) que consiste en disparar micropartículas a la planta con la suficiente fuerza como para que entren en las células y dejen el ADN. Estos microproyectiles son de oro, con un diámetro de 0,6 micras y están recubiertos de ADN plasmídico. La fuerza de propulsión se consigue con el gas inerte helio. Los microproyectiles van colocados sobre un macroproyectil que queda retenido en el disco de parada tras el disparo y libera los microproyectiles para que alcancen las células vegetales.

Por otro lado, hay otro sistema probado en tabaco que consiste en un tratamiento de los protoplastos con polietilenglicol (PEG) en presencia del vector de transformación que facilitará el traspaso de las moléculas de ADN a los protoplastos ya que el PEG induce la formación de poros en las membranas

de las células para la entrada del material genético (O'Neill et al.1993), (Potrykus et al, 1991).

La transformación se lleva a cabo en un número muy bajo de copias de ADN pero se favorece la proliferación de los genomas transformados al colocarlos en un medio selectivo que, generalmente, incluye un antibiótico. Esto es así porque el vector de transformación incluye un gen de resistencia a un antibiótico junto con el gen que se quiere transferir al genoma de la planta (Moll et al. 1990). Los sectores transformados se diferencian de los no transformados por que permanecerán de color verde mientras que estos últimos adquirirán un color blanquecino (por no ser resistentes al antibiótico del medio). Además, la transformación se ve acelerada con la dediferenciación de cloroplasto a proplastidio.

El objetivo es conseguir plantas transformadas y homoplásmicas. Homoplasma es la presencia de un único material genético en el genoma de los plastidios. Para conseguir esto, se lleva a cabo la regeneración de brotes de los sectores transformados inicialmente, haciéndose dos o tres rondas de selección (Svab et al., 1990; Svab et al 1993).

La primera vez que se consiguió la transformación plastidial fue en *Chlamydomonas reinhardtii*, un alga unicelular con un único cloroplasto que ocupa aproximadamente el 60% del volumen de la célula, en el año 1988 (Boynton et al. 1988). Dos años más tarde se consiguió la transformación del genoma plastidial en tabaco (Svab et al. 1990).

1.2.- Genes marcadores de selección: importancia y tipos

Los genes marcadores son una herramienta indispensable en la transformación genética puesto que permite seleccionar aquellas células, tejidos y plantas que han sido transformados.

Junto con el gen de interés que se quiere introducir en las plantas, es necesario introducir a la par un gen marcador de selección, normalmente de resistencia a un antibiótico, de manera que si los tejidos vegetales se desarrollan sobre un medio que contiene dicho antibiótico, proliferarán aquellas células que

han sido transformadas. El objetivo es conseguir plantas homoplásmicas (es decir, plantas en las cuales todos los plastomas de todas las células estén transformados) portadoras del gen de interés y ello solo se podrá conseguir mediante el gen marcador de selección puesto que solo así proliferarán las células que sean resistentes al antibiótico.

Son necesarias varias rondas de selección, es decir, subcultivar los explantos en el medio+antibiótico para conseguir el estado de homoplasma.

El repertorio de genes marcadores es muy escaso.

Los primeros marcadores que se utilizaron a principios de 1990 fueron mutaciones puntuales que confieren resistencia a determinados antibióticos. Estas mutaciones son genes recesivos y 100 veces menos eficientes que el gen *aadA* de *E.coli*.

- Mutación *rrn16* (16S rRNA)

Confiere resistencia a espectinomicina y estreptinomicina.

Una mutación que confiere resistencia a la estreptinomicina se ha localizado en el gen 16S RNAr (*rrs*) vinculada en cuanto a su localización a zonas de los nucleótidos 530 y 912 (Harris et al. 1989; Maliga et al. 1991).

Se han identificado tres mutaciones en esta región que resulta en tres niveles diferentes de resistencia al antibiótico in vitro.

- Mutación *rps12* (ribosoma):

Confiere resistencia a estreptinomicina.

La resistencia a la estreptinomicina ha sido ampliamente estudiada y se ha demostrado que se produce por un mecanismo de mutación relacionado con el gen de la proteína ribosomal S12 produciéndose alteraciones en la secuencia de sus aminoácidos (Ruiz et al. 2003).

- Gen *aadA* (*E. coli*):

Es un método más eficiente que las mutaciones puntuales. Este gen, procedente de *Escherichia coli*, codifica la enzima aminoglucósido 3' adeniltransferasa que confiere resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptinomicina (Goldschmidt-Clermont et al. 1991).

- Genes *nptII*, *aphA-6*:

El gen *nptII*, procedente del transposón bacteriano Tn5 codifica la enzima neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico kanamicina.

El gen *aphA-6* se utilizó por primera vez en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Bateman and Purton 2000), procede del organismo *Acinetobacter baumannii* y codifica la enzima aminoglucósido fosfotransferasa la cual le confiere resistencia al antibiótico kanamicina (Huang et al.2002).

- Gen *cat*:

Otro de los genes marcadores utilizados es el denominado *cat* (Li et al. 2010). La enzima bacteriana cloranfenicol acetiltransferasa actúa desactivando el antibiótico cloranfenicol, el cual detiene la síntesis proteica en las mitocondrias, por lo que confiere resistencia a dicho antibiótico. Aunque este gen marcador de selección resulta menos eficiente que el *aadA*, tiene la ventaja de que no produce resistencia espontánea por mutación.

- Gen *ASA2*:

El gen *ASA2* es otro de los genes marcadores de selección utilizados (Barone et al. 2009) y se basa en intervenir en la ruta metabólica del aminoácido triptófano. La enzima antranilato sintasa, formada por dos subunidades α y dos subunidades β cataliza la primera reacción de esta ruta convirtiendo el corismato en antranilato y es inhibida por retroalimentación a través del producto final que es el triptófano, el cual se une a la subunidad α de dicha enzima. Existen análogos al triptófano que imitan su actividad y también pueden unirse a la subunidad α de la antranilato sintasa provocando la

inhibición de la síntesis de este aminoácido. Se aisló una subunidad α (ASA2) que era insensible a esta retroalimentación por análogos al triptófano (Song et al., 1998) por lo que al colocar la célula en un medio con uno de estos análogos resulta resistente a su toxicidad y por ello en una manera de seleccionar las células transformadas.

También existen marcadores de selección secundarios basados en la resistencia a determinados herbicidas pero nunca se han obtenido con éxito transformantes usándolos como marcador primario debido a que son compuestos letales para la célula ya que se rompen las membranas externa, tilacoides y se da desorganización de los grana. Sin embargo, los antibióticos espectinomycin y estreptomycin no resultan letales para la célula, simplemente se inhibe el reverdecimiento de los explantos, división celular y formación de brotes de cultivo, pero no matan a las células. (Svab. 1990)

De cualquier manera, el antibiótico se debe de utilizar en la dosis correcta ya que si es demasiado elevado no da tiempo a que las células sintetizen la proteína que detoxifique el antibiótico.

1.3.- Sistemas de eliminación de genes marcadores

Una vez que se ha alcanzado el estado de homoplasma, conviene eliminar el gen marcador de selección. Esto es importante por varias razones: el hecho de tener que expresar constantemente grandes cantidades de este gen implica una carga metabólica muy alta e innecesaria para la célula; por otra parte, el hecho de que los genes marcadores se basen en la resistencia a determinados antibióticos constituye un peligro de transmisión de dichas resistencias a otros organismos, tales como bacterias, haciéndose resistentes con su posible riesgo hacia la salud humana por la disminución de eficacia de los antibióticos comerciales.

Dos son los sistemas más estudiados para la eliminación de genes marcadores: el sistema *attB/attP* catalizado por la integrasa *phiC31*; y el sistema *loxP* mediado por la recombinasa *Cre*.

Sistema Cre/lox

Este sistema se basa en la idea de que la recombinasa Cre reconoce unas secuencias, llamadas regiones *loxP*, y elimina el fragmento de ADN plastidial que se encuentre flanqueada por estas dos regiones.

- Regiones loxP

Las regiones lox son los llamados loci de recombinación, los cuales están constituidos por 34 pares de bases divididos en 13 pb de forma palindrómica, es decir, que se leen igual al derecho que al revés, y separadas por un conector asimétrico de 8 pares de bases. La secuencia de nucleótidos que forman esta región es la siguiente:

ATAACTTCGTATA	ATGTATGC	TATACGAAGTTAT
TATTGAAGCATAT	TAGATACG	ATATGCTTCAATA

Estas secuencias son las que reconoce la recombinasa CRE y actúa sobre el fragmento de ADN al cual flanquean, bien eliminándolo o bien invirtiendo su secuencia.

- Recombinasa CRE

La enzima CRE es una recombinasa monomérica y asimétrica, de la familia de las integrasas, cuyo nombre proviene de “Cyclization **R**ecombination”, tiene un tamaño de 38 kDA y deriva del bacteriófago P1, del cual fue extraída y purificada por (Abremnski and Hoess. 1983). Por tanto, se trata de una enzima de origen procariota.

Esta enzima tiene dos papeles fundamentales en la vida del bacteriófago del cual proviene: en primer lugar proporciona un mecanismo de reserva para ciclar el ADN después de la infección y, por otro lado, realza la estabilidad en los lisogenes bacterianos mejorando la capacidad de división de la bacteria.

La importancia de esta enzima radica en su capacidad para reconocer unas regiones específicas del ADN, llamadas regiones lox o loci de recombinación, y cataliza una recombinación entre dos regiones lox. Esta recombinación puede

ser de dos maneras dependiendo de si los loci se encuentran orientados en la misma dirección o están inversamente orientados.

Si las regiones lox se encuentran orientadas en la misma dirección, la acción que lleva a cabo la recombinasa es la supresión del fragmento de ADN que se encuentra entre ambos loci.

En cambio, si las regiones lox se encuentran orientadas inversamente, la recombinación resultante no es la escisión del fragmento sino más bien el fragmento se conserva pero se invierte su secuencia.

Para que se dé la recombinación, esta proteína se une al ADN sin ayuda de cofactores y sin importar la forma de éste, ya sea superenrollado, lineal o circular.

La cualidad más sobresaliente de este sistema es la capacidad de inactivar la función de un gen tan solo en aquellas células del organismo que expresen la recombinasa Cre.

Este sistema permite, pues, suprimir secuencias del ADN genómico o, como últimamente se viene estudiando cada vez más, del ADN plastidial.

Una de las aplicaciones más interesantes que se están estudiando y llevando a la práctica es la eliminación del gen marcador de selección mediante este método Cre/Lox. La idea es sencilla, al insertar el gen marcador en el ADN este gen iría flanqueado por dos regiones lox orientadas en la misma dirección. De esta manera, la eliminación del gen marcador después de haber conseguido plantas transgénicas y homoplásmicas, no supone demasiado problema ya que se podría utilizar este sistema de la recombinasa Cre para que reconozca estas dos secuencias y suprima el contenido genómico entre ambas.

La forma que se utiliza para asegurarse de que la recombinasa llegue al plastidio es fusionar la región terminal N de la recombinasa con un pequeño péptido de tránsito de la RubisCO, enzima que cataliza la fijación de CO₂ en el Ciclo de Calvin de la fotosíntesis y que tiene lugar en los cloroplastos. Este péptido de tránsito dirige la CRE al estroma del cloroplasto.

Este sistema Cre / lox no solamente se ha estudiado y utilizado en plantas, sino también en mamíferos, como por ejemplo, en ratones (Sauer et al. 1998)

Sistema *attB/attP*

Este sistema inicialmente se utilizó para llevar a cabo transformación plastidial estable. Más adelante (Lutz et al. 2007) se estudió otra aplicación diferente de la integrasa *phiC31* para la eliminación de genes marcadores flanqueados por las secuencias *attB* y *attP*.

Este sistema se basa en que la integrasa *phiC31* elimina las secuencias comprendidas entre dos secuencias *attB* y *attP*. De esta manera, si el gen marcador de selección está flanqueado por dichas secuencias, al introducir la recombinasa en el núcleo celular, ésta mediará la recombinación entre ambas produciéndose la escisión del gen.

Una ventaja de este sistema respecto al anterior es que estas secuencias no son homólogas por lo que el genoma plastidial portador de genes marcadores flanqueados por secuencias *att* se predice que sea más estable.

Además, existen otros métodos para la eliminación de genes marcadores, los cuales se describen a continuación:

Cotransformación con dos vectores independientes

Se trata de una estrategia sencilla que consiste en insertar en el genoma plastidial los dos genes, el transgén de interés y el gen marcador de selección, mediante dos vectores independientes. Al producirse la cotransformación, los dos genes se insertan en regiones diferentes del plastoma en forma no ligada. De esta manera será posible su segregación y se conseguirán líneas que no contengan en gen marcador de selección. Sólo se ha utilizado con éxito cuando el gen de interés confiere resistencia a un herbicida y ambos agentes de selección se usan de forma consecutiva (Ye et al 2003.)

Secuencias repetidas directas (175 nt) que flanquean el gen marcador (recombinación homóloga)

Las secuencias repetidas directas son dos o más tramos de ADN en una única molécula que tienen la misma secuencia de nucleótidos en la misma orientación y son las responsables de la recombinación denominada transposición.

Unos estudios (Iamtham & Day et al 2000) demostraron cómo se puede obtener plantas sin el gen marcador de selección basándose en esta técnica. Si se hallan dos secuencias repetidas directas flanqueando un gen o un conjunto de genes, puede darse una recombinación consistente en eliminar la zona que se encuentra entre estas dos secuencias. Por otro lado, si existen tres secuencias repetidas directas puede darse la recombinación entre estas tres secuencias de dos maneras diferentes pudiendo saltar uno o dos genes, dando lugar a plantas heteroplásmicas que más adelante serán homoplásmicas después de sucesivas divisiones celulares.

Además, cuando la recombinación se activa por las secuencias repetidas directas, el proceso continúa hasta que se ha dado toda la recombinación

Otra variante de este proceso (Dufourmantel et al 2007) consiste en introducir el gen marcador *aadA* en medio del transgén, llevando unas secuencias repetidas de 403 nucleótidos. Al recombinar estas dos secuencias se elimina el gen *aadA* y se hace activo el transgén, siempre que no se rompa la pauta de lectura.

Cointegración transitoria

Este método no consiste en introducir en el genoma el gen marcador únicamente, sino que se basa en la creación de mutaciones en el cloroplasto (Klaus et al. 2003) de manera que las plantas transformadas tengan una pigmentación diferente y se distingan visualmente del fenotipo sin transformar. Además, se utilizará un gen marcador de selección *aadA* que aporta resistencia a la espectinomicina y estreptinomicina. De esta manera, los regenerantes en medio con antibiótico tendrán un fenotipo diferente a la planta sin transformar.

Las líneas mutantes homoplásmicas son retransformadas usando un segundo gen marcador, *aphA-6*, reincorporando el gen eliminado del cloroplasto (complementación) y eliminando el *aadA*, volviendo a tener un fenotipo normal, como las plantas no transformadas.

Así se evita el problema de tener “falsos positivos”, es decir, regenerantes en medio con antibiótico y que no hayan sido transformados.

1.4.- Métodos utilizados para introducir la recombinasa CRE

Existen diferentes métodos para introducir la Cre al interior de las células vegetales.

Estos métodos son: mediante transformación nuclear, a través de la polinización de la planta transplastómica con un transformante nuclear que lleve el gen *cre* o, como se realiza en este trabajo, mediante su integración transitoria. En todos los casos, para garantizar que la recombinasa Cre se dirija hacia los plastidios, se une a un péptido de tránsito de la RubisCO en su extremo N-terminal.

- Nuclear

En este caso, se introduce el gen *cre* en el núcleo de la planta transplastómica mediante transformación por *Agrobacterium tumefaciens*. Los resultados obtenidos han sido favorables en cuanto a la supresión del gen marcador de selección, en este caso *aadA*, flanqueado por dos regiones *lox*, quedando solamente una secuencia *lox* entre *TrbcL* y *Prrn*. Sin embargo, se ha observado que en varias ocasiones no solamente se ha suprimido este fragmento sino la parte del genoma plastidial comprendida entre las dos secuencias *Prrn* por recombinación homóloga (Sylvie et al, 2001. Plant Journal, 171, 178) eliminándose el gen *aadA* y *trnV*.

El gen Cre se puede eliminar mediante reproducción sexual en la descendencia. El 25% de la descendencia eliminará este gen, según la herencia mendeliana.

- Polinización

Este método consiste en introducir el gen *Cre* en el interior de la planta transplastómica mediante polinización. Por un lado se crean plantas transgénicas nucleares que portan el gen *Cre* y por otro lado se tienen plantas transplastómicas con el gen marcador de selección que se desea eliminar flanqueado por dos secuencias *lox*. Las plantas transplastómicas se utilizarán como material materno ya que los cloroplastos son de herencia materna y, por tanto, de esta manera se heredará el genoma plastidial deseado en la progenie.

Los resultados son más optimistas que el método comentado anteriormente ya que no se produce la escisión de la región *trnV*.

No siempre se produce la recombinación pudiendo producirse un estado de heteroplasma puesto que habrá copias del genoma plastidial que contengan el gen marcador y otras copias que no lo tengan (Sylvie et al, 2001).

- Transitoria

En este caso no se integra el gen *Cre* dentro del núcleo celular sino que se expresa en un momento determinado y luego se elimina. Al no integrarse en el núcleo y al estar expresándose poco tiempo se planteó la posibilidad de que los niveles de expresión no fuesen suficientes para eliminar el gen marcador de la mayoría de los genomas plastidiales, al contrario de lo que cabría esperar al introducirlo dentro del núcleo celular. Unos experimentos (Lutz et al.2006) demostraron que sí es posible conseguir plantas que carezcan del gen marcador de selección mediante la expresión transitoria de la recombinasa *Cre* con una eficacia del 10%.

Este sistema presenta una ventaja clara respecto a los dos anteriores y es que se ahorra tiempo en el sentido de que no es necesario eliminar la *Cre* del interior del núcleo celular puesto que no se integra en éste. Por otro lado el hecho de que solamente se encuentre durante un corto periodo de tiempo reduce las posibilidades de que se eliminen otras regiones del ADN plastidial flanqueadas por secuencias que funcionen de igual manera que las *lox* como puede ocurrir con la integración nuclear.

El método utilizado para introducir la *Cre* en el interior de la planta y que se exprese de forma transitoria es mediante agroinfiltración. Se utiliza *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el plásmido *Cre* en el vector de transformación. Este método consiste en someter a vacío la suspensión de *Agrobacterium* en contacto con los explantos de hoja de planta transplastómica de manera que pasen al interior celular. La recombinasa se expresa durante un periodo de 2 a 4 días después de la Agroinfiltración (Johansen et al, 2001; Voinnet et al, 2003). Durante 2 ó 4 días se tendrán los explantos en oscuridad, entorno óptimo para mayor actividad de *Agrobacterium*. Después, tendrá lugar la organogénesis de los explantos en un medio que contenga un antibiótico específico letal para *Agrobacterium*, como cefotaxima. De esta manera, la recombinasa *Cre* se expresa fugazmente permaneciendo en contacto con el material vegetal un corto periodo de tiempo sin integrarse en el núcleo celular.

2.- Objetivos

- 1- Poner a punto el sistema de agroinfiltración con vacío para explantos de hojas de tabaco.
- 2- Estudiar la influencia que puede tener la diferencia de presión de vacío en la agroinfiltración, concretamente entre 2 y 10 Torr.
- 3- Estudiar la influencia del tiempo de cocultivo de los explantos con *Agrobacterium* tras el proceso de agroinfiltración, concretamente entre 2 y 4 días.
- 4- Caracterización molecular de las plantas regeneradas mediante PCR y Southern blot.

3.- Materiales y métodos

3.1.- Material

3.1.1.- Material vegetal

Se va a trabajar con plantas transplastómicas de *Nicotiana tabacum* obtenidas a partir de las variedades Havana 503-B y Virginia Gold. Éstas incluyen el gen *tioredoxina f* en el cloroplasto así como el gen marcador de selección *aadA*.

Denominaremos a estas variedades mediante abreviaturas (Tabla 1).

Tabla 1: Variedades de tabaco utilizadas durante todo el proceso y abreviaturas correspondientes a cada una de ellas con las que se les denominará en el escrito con el fin de facilitar la relación de los términos.

Variedad de tabaco	Abreviatura
Havana 503-B	503B
Virginia Gold	Vir

Las semillas de estas variedades de tabaco las encontramos en el laboratorio 3 del Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales de la Universidad Pública de Navarra.

3.1.2.- Medios de cultivo

Los medios que se van a utilizar para la germinación, crecimiento, enraizamiento y diferenciación de células vegetales a lo largo de todo el trabajo son los siguientes:

- Medio P3
- Medio P3 + Espectinomicina
- Medio RMOP
- Medio RMOP + Cefotaxima

Por otro lado, una parte del trabajo consiste en el crecimiento, multiplicación y preparación del *Agrobacterium* portadora del plásmido CRE, para lo cual utilizamos los siguientes medios:

- Medio LB agar + Kanamicina
- Medio LB líquido + Kanamicina
- Medio LBMA
- Medio MMA

3.1.3.- Vector de transformación

El vector de transformación (Figura 2) incluye la *tiorredoxina f* y el gen marcador de selección *aadA* flanqueado por dos secuencias *lox*.

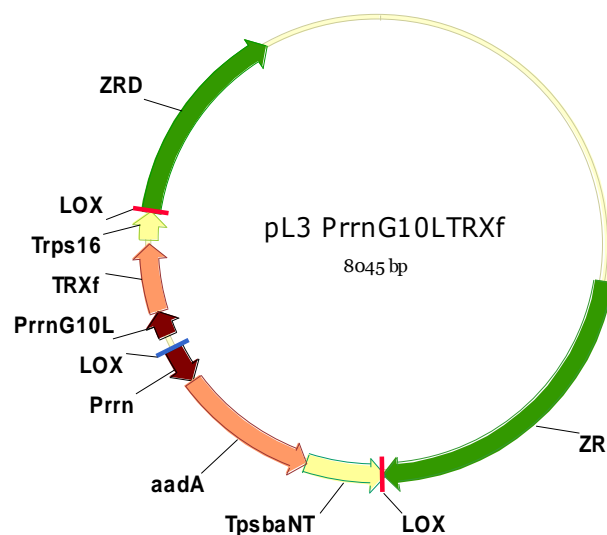


Figura 2: Vector de transformación del genoma plastidial de tabaco. (ZRD: zona de recombinação derecha; ZRI: zona de recombinação izquierda; Lox: zonas de recombinação; *aadA*: gen marcador de selección; TRXf: *tiorredoxina f*; TpsbaNT: terminador del *aadA*; Prrn: promotor del *aadA*; PRRnG10L: promotor de la TRXf; Trps 16: terminador de la TRXf).

Para la transformación se utilizó la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que contenía el plásmido CRE.

La cepa que se utilizó fue: Agro gv 3101-pBin20 ssuCRE, la cual se conservó en una Placa Petri con medio sólido LB + Kanamicina 50 mg/L y manteniéndola a 4°C.

3.2.- Métodos

3.2.1.- Desinfección de semillas y siembra

Protocolo para la desinfección de semillas

- Desinfectar con Etanol 70% durante un minuto.
- Se prepara lejía comercial diluida en agua en una proporción 1:4 y se añaden 5 microlitros de Tween20.
- Se ponen las semillas en un eppendorf y se añade 1 ml de la disolución lejía:agua
- Agitar fuerte con un Vortex durante 20 minutos.
- En la cabina de flujo laminar lavar las semillas en el eppendorf con 1 ml de agua estéril 6 veces.
- Tras el último lavado no descartar el agua. Coger con la pipeta de 1 ml agua con semillas y echarlas al bote con el medio, esparciéndolas lo máximo posible.
- Posteriormente se sellarán los botes con cinta adhesiva porosa (Leucopore), con el fin de evitar la entrada de agentes contaminantes y se almacenarán en la cámara de cultivo.

El medio sobre el que se sembraron las semillas era P3 + espectinomicina. La razón por la que el medio contenía el antibiótico espectinomicina es que las semillas eran transplastómicas y contenían un gen marcador de selección, aadA, que confiere resistencia a este antibiótico por lo que al sembrar las semillas en un medio con espectinomicina nos aseguramos que las plántulas que se desarrollen tienen dicho gen que es el que nos interesa eliminar mediante este trabajo.

Protocolo para la preparación de medio P3:

- 4,41 g/l de sales Murashige & Skoog con vitaminas (Duchefa)
- 30 g/l de sacarosa
- Con un probeta enrasar hasta 1 litro
- Llevar el pH a 5,7 - 5,8

- 6 g/l de microagar

Después se dispensa con un falcon 50 ml del medio en recipientes estériles y se guardan en la cámara fría hasta que se necesiten.

3.2.2.- Individualización de plántulas

Después de 2 ó 3 semanas desde que se pusieron a germinar, el siguiente paso es individualizar las plántulas ya que el número de semillas que germinan es muy elevado y comenzará pronto la competencia por los nutrientes del medio y por la luz.

Con la individualización lo que se consigue es un mejor y mayor crecimiento de las plántulas sin competencias de espacio o nutrientes.

En cabina de flujo laminar y con pinzas estériles, manteniendo siempre las condiciones asépticas, se traspasan las plántulas en número de 3 unidades por bote. No es necesario traspasar todas las plántulas germinadas, ya que con 5 ó 6 botes de 3 plántulas cada uno es suficiente para la primera tanda de experimentación.

Las plántulas se colocarán en el medio de cultivo lo más separadas posible para que la competencia por los nutrientes sea mínima (Figura 3).

Las nuevas plántulas también irán en medio P3 + espectinomicina al igual que las anteriores y se colocarán en el mismo lugar de la cámara.



Figura 3: Individualización de plántulas de tabaco

3.2.3.- Preparación del *Agrobacterium* para la agroinfiltración

La preparación del *Agrobacterium* para la agroinfiltración es un proceso que dura dos días.

- **Día 1:**

Se prepara medio LB líquido y se vierten 50 ml de este medio a un matraz estéril de 250 ml. A continuación, se añadirán 25 microlitros del antibiótico Kanamicina.

Una vez preparado esto se pica con una pipeta una colonia de *Agrobacterium* de la placa Petri anteriormente guardada en la cámara frigorífica del laboratorio y se deposita la colonia dentro del medio LB + Kanamicina. Para esto se succiona y se echa varias veces con la pipeta colocada en el interior del medio líquido.

Todo el trabajo con bacterias se realiza en la cabina de bacterias para evitar contaminaciones en el resto del laboratorio.

El medio LB + Kanamicina con la colonia de *Agrobacterium* se guarda en el agitador durante 1 día.

Protocolo para la preparación de 1 litro de medio LB:

- Se pesan 20 gramos de LB Broth
- Se añaden a una botella y se enrasa hasta 1 litro de agua MilliQ con una probeta.

A continuación se autoclava.

- **Día 2:**

En primer lugar, se prepara en una botella 600 ml de medio LBMA y se dispensan 100 ml/matraz en 6 matraces estériles de 500 ml.

En cada matraz se añade Kanamicina y acetosiringona:

- Kanamicina: 50 mg/L
- Acetosiringona: 12 μ M

Una vez que tenemos los 6 matraces con el medio LBMA se les añade a cada uno 1 ml del medio LB con *Agrobacterium* que teníamos en el agitador del día anterior y se guardan en el mismo agitador hasta el día siguiente.

Protocolo para la preparación del medio LBMA (1 litro):

- Se pesan 20 gramos de LB Broth
- MES: 10 mM. Para conseguir esta concentración se añaden 2,1325 gramos de MES

Como lo que necesitamos son 600 ml de este medio, las cantidades son las siguientes:

- 12 gramos LB Broth
- 1,2795 gramos MES

Inicialmente se preparó un stock de medio MES por lo que en vez de pesar una cantidad se cogió la cantidad con una pipeta, en concreto, 12 ml.

Una vez pesados los gramos de LB Broth y añadido los 12 ml de medio MES, se enrasa hasta 600 ml con agua MilliQ y se autoclava.

Protocolo para la preparación de medio RMOP:

- Sales minerales y vitaminas MS (Duchefa): 4,302 g/L
- Sacarosa 3%: 30 g/L
- Myoinositol: 0,1 g/L
- Thyamine-HCL: 1ml/L
- BAP: 1mg/L
- NAA: 0,1mg/L

Se enrasa con agua MilliQ hasta 1 litro.

- pH: 5,7- 5,8. Ajustar con KOH
- Microagar 0,7%: 7 g/L

Se autoclava. (Los antibióticos, esterilizados por filtración, se añaden después de autoclavar)

*La preparación del medio RMOP + Cefotaxima es el mismo procedimiento pero añadiendo este antibiótico tras autoclavar.

3.2.4.- Agroinfiltración

- Día 3: Agroinfiltración

En primer lugar se sacan los 6 matraces del agitador que se habían colocado el día anterior y, en la cabina de bacterias, se vierten en 3 tubos de centrifuga. En cada uno de estos tubos se verterá el contenido de dos matraces de manera que se consiga el mismo volumen en todos ellos con el objetivo de que el peso esté equilibrado y la centrífuga funcione correctamente.

Se colocan los tubos en la centrífuga de forma equilibrada y se centrifuga a 4000 g durante 15 minutos.

Pasado este tiempo, se sacan los tubos de la centrífuga y se trabaja en la cabina de flujo laminar.

Se vierte el líquido de cada tubo de centrifuga en un vaso y nos quedamos con el pellet adherido al fondo, en un lateral, del tubo.

Una vez tengo los pellets en cada tubo se vierten 10 ml de medio MMA, anteriormente preparado, y se va deshaciendo el pellet succionando y echando el líquido sobre el pellet de forma que ya no quede adherido sino disuelto en el medio líquido.

Cuando ya tengo deshechos los pellets se vierte el contenido en un mismo tubo de centrifuga.

El siguiente paso es medir la densidad óptica. Esto se mide en un espectrofotómetro.

El espectrofotómetro es una máquina que proyecta un haz de luz monocromática a través de una muestra y mide la cantidad de luz absorbida por la muestra, de lo que podemos deducir la concentración de, en este caso, *Agrobacterium* que tenemos.

Como lo que se quiere conseguir es una densidad óptica de 2,4 a una longitud de onda de 660 nm, habrá que medir la densidad óptica que tenemos

para, después, hacer la dilución correspondiente y conseguir la densidad óptica deseada.

Para medir la densidad óptica se hacen diluciones seriadas: $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$.

Para conseguir estas diluciones se vierten 600 ml de medio MMA en cada eppendorf y otros 600 ml del eppendorf anterior; de esta manera se consigue que cada eppendorf tenga una densidad óptica la mitad que el anterior.

Hacemos tantas diluciones porque el espectrofotómetro mide bien densidades entre 0 y 1 por lo que cuanto mayor sea la dilución, más correctamente medirá la densidad óptica.

Ejemplo de cálculo:

Supongamos:

Con la dilución 1/32 nos da una densidad óptica de 0,86 y queremos una densidad óptica de 2,4:

$2,4/0,86 = 2,8$ veces más concentrada tiene que estar

$32/2,8 = 11,4$ veces habría que diluir el original

Quiero un volumen final de 160 ml (porque voy a poner 4 botellas de 100 ml con 40 ml cada una)

*$160/11,4 = 14$ ml es el volumen que cojo de *Agrobacterium**

$160-14 = 146$ ml es el volumen que cojo de medio MMA

Tras hacer la dilución, se coloca el cultivo de *Agrobacterium* en un agitador orbital con una estufa al lado y se mantiene en agitación suave durante una hora.

El motivo de la estufa es porque *Agrobacterium* trabaja mejor con una temperatura más elevada que la ambiente.

Durante esta hora se favorece la activación del *Agrobacterium* con la acetosiringona que lleva el medio MMA.

Pasados 40 minutos se puede ir haciendo el siguiente paso, que es la preparación del material vegetal.

Se llevan algunos botes de plantas de tabaco de la misma variedad a la cabina de flujo laminar para trabajar allí con ellas evitando, en la medida de lo posible, que se contaminen de organismos patógenos.

Esta parte del trabajo consiste en cortar fragmentos de hoja de 1 cm² aproximadamente, quitando previamente el nervio central. Se cortarán con bisturí y pinzas estériles autoclavadas y se irán esterilizando en el hornillo de bolas periódicamente mientras trabajamos en la cabina para evitar una posible contaminación del material vegetal.

La hoja a cortar se colocará encima de una Placa Petri también estéril.

Normalmente con 4 hojas de tabaco es suficiente para conseguir una cantidad de explantos adecuada al total que pueden caber en un bote de 100 ml que utilizaremos después para la agroinfiltración. Si las hojas son pequeñas quizás se necesiten algunas hojas más.

A continuación, se vierten 40 ml de cultivo de *Agrobacterium* con el medio MMA (que teníamos puesto en agitación suave durante una hora) en frascos de 100 ml en la cabina de flujo laminar y con las pinzas se van colocando aproximadamente 12-15 de los explantos que se han cortado poniendo el envés en contacto con el medio.

Dos de los cuatro frascos de 100 ml que tenemos con *Agrobacterium* y con los explantos los someteremos a una presión de vacío de 2 torr y a la otra mitad a una presión de 10 torr.

En primer lugar se tiene que preparar la bomba de vacío y tenerlo todo a punto para meter los botes.

Sometemos a una presión de vacío de 2 torr a dos de los frascos durante 20 minutos y al finalizar esta tanda se someterá a una presión de 10 torr a los frascos restantes, también durante 20 minutos.

Mientras se está sometiendo a vacío se va agitando suavemente para favorecer el contacto de los explantos con el medio de *Agrobacterium*.

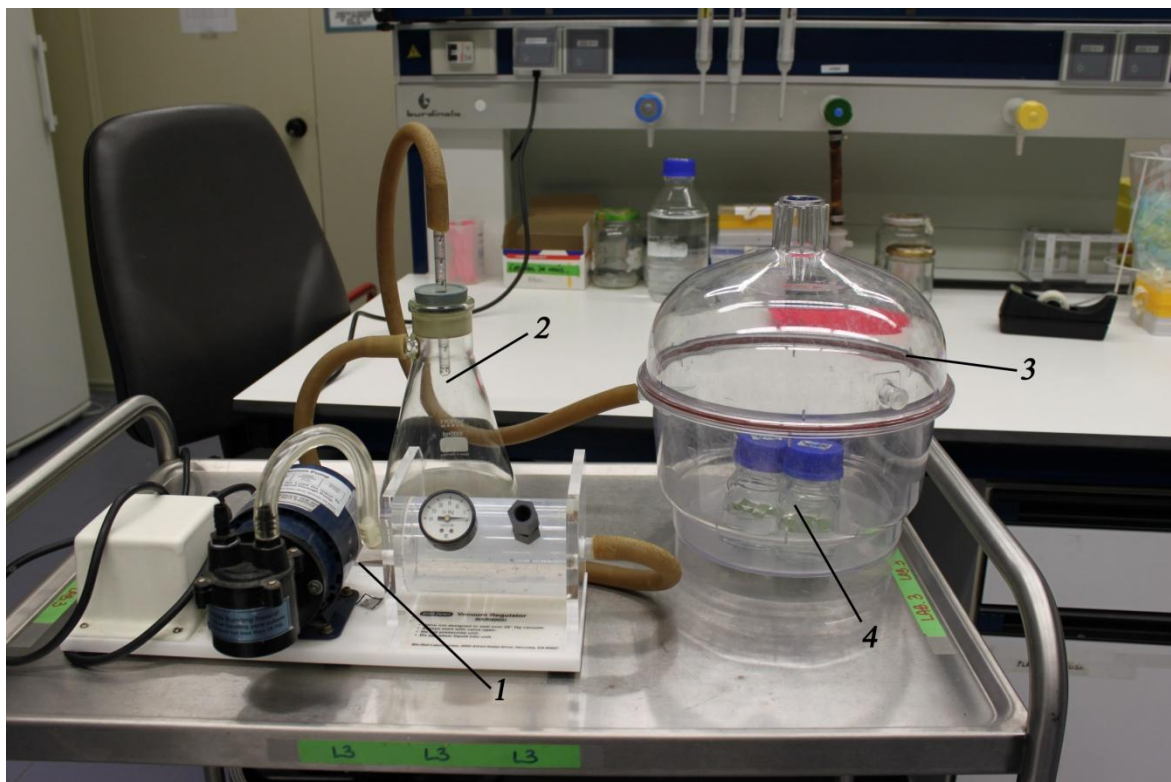


Figura 4: Montaje realizado para la agroinfiltración. (1) Bomba de vacío, (2) matraz kitasatos, (3) campana donde se crea vacío, (4) recipiente donde se colocan los explantos en contacto con *Agrobacterium*. La bomba de vacío se conecta a la corriente para funcionar y se varía la presión de vacío que queremos ejercer. Se conecta la bomba de vacío con el (3) a través del tubo, teniendo en cuenta que el (3) esté cerrado por todas sus posibles aperturas de forma que se pueda ejercer vacío sobre él. Los recipientes con los explantos (4) están dentro del (3) y cuando se ejerce vacío el *Agrobacterium* entra dentro del material vegetal. Es importante que los recipientes (4) no tengan el tapón cerrado totalmente para que la presión entre dentro de ellos.

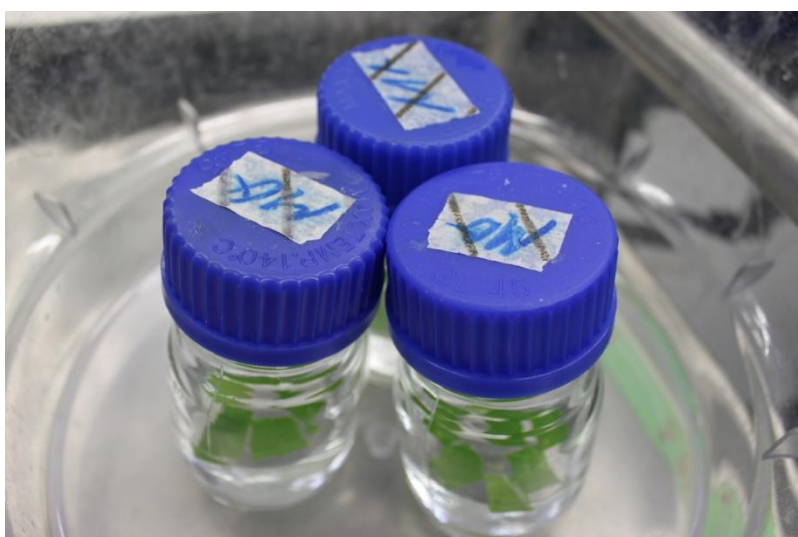


Figura 5: Detalle de los recipientes con los fragmentos de hoja suspendidos sobre el medio de *Agrobacterium* antes de realizarse la agroinfiltración.

Al finalizar cada tanda de agroinfiltración, se abrirá el paso del aire de la bomba para que deje de haber vacío y así poder abrir la tapa.

Una vez ya se han sometido a vacío se llevan los botes a la cabina de flujo laminar y los explantos se colocan en cajas magenta con medio RMOP sin antibiótico. Se colocarán 9 explantos por caja con el envés en contacto con el medio.

Las cajas se sellan con cinta Leucopore la cual permite el intercambio gaseoso entre el interior y el exterior de la caja pero evita la entrada de organismos patógenos tales como esporas de hongos o bacterias.

Una vez terminado de colocar los explantos, las cajas magenta se meten en una caja opaca de forma que permanezcan en oscuridad en todo momento y se llevan a la cámara de cultivo.

También se va a tener un control de explantos de hojas sin agroinfiltrar para comprobar que crecen bien en los medios. En lugar de tenerlos sobre el medio de *Agrobacterium*, se tendrán sobre medio MMA y sin someter a vacío.

La agroinfiltración se realizó mediante 4 condiciones distintas:

Tabla 2: Condiciones de agroinfiltración y cocultivo *Agrobacterium*

Condición	Presión de vacío en agroinfiltración	Días en contacto con <i>Agrobacterium</i>
1	2 Torr	2
2	2 Torr	4
3	10 Torr	2
4	10 Torr	4

Protocolo para la preparación de medio MMA (1 litro)

- Sales Murashige & Skoog y vitaminas: 4,30209 g/L
- MES: 10mM
- Sacarosa: 20 g/L
- Acetosiringona: 200 μ

3.2.5.- Subcultivo de los explantos a medio RMOP + Cefotaxima

Otro de los factores que se van a estudiar es el tiempo que van a permanecer los explantos en oscuridad en medio RMOP y en contacto con el *Agrobacterium*. Se van a tener de esta manera 2 y 4 días.

Así pues, a los 2 días se cambiará la mitad de las cajas a otro medio, poniendo los explantos en medio RMOP + Cefotaxima, antibiótico que mata al *Agrobacterium*.

De la misma forma, pasados 4 días se cambiarán de medio el resto de explantos de las cajas magenta que aún permanecen en contacto con *Agrobacterium* y en oscuridad, también a medio RMOP + Cefotaxima.

En este nuevo medio se colocarán 5 explantos por caja en lugar de 9 como en el medio RMOP sin antibiótico ya que en este nuevo medio van a permanecer mucho más tiempo y donde tendrá lugar la organogénesis; aumentarán de tamaño los explantos y se formará callo, proliferarán brotes, raíces...Por tanto van a necesitar más espacio para crecer y desarrollarse.

3.2.6.- Subcultivo de brotes a medio de enraizamiento

Pasadas unas semanas, de los explantos saldrán brotes que habrá que cortar y poner a enraizar (Figura 6).



Figura 6: Detalle de un brote fruto de la organogénesis en medio RMOP

Se cortarán dos brotes de cada uno de los explantos de las cajas magenta colocados sobre medio RMOP + Cefotaxima.

Todo este trabajo se realiza en la cabina de flujo laminar para evitar o minimizar cualquier contaminación, con pinzas, bisturí y Placas Petri estériles.

Los brotes se cortarán por su base y se colocarán 3 brotes por bote.

El medio de enraizamiento será P3 como el utilizado anteriormente pero con la diferencia de que contendrá también el antibiótico Cefotaxima. Aunque ya se puso este antibiótico en las cajas magenta con medio RMOP para matar a *Agrobacterium* se vio que en muchas ocasiones no era suficiente para matarlo, sino solo para frenar su crecimiento, por lo que se hace necesario añadirlo también en este nuevo medio para evitar problemas de crecimiento incontrolado de la colonia.

Una vez se tienen los tres brotes en el medio, el bote se sella con cinta Millipore.

3.2.7.- Trasplante a jiffy

Las plantas en medio P3 + Cefotaxima enraizarán y crecerán. Si en el momento de cortar los brotes del callo nos lleváramos también parte de éste, en este medio crecerá una masa de pequeñas plántulas que no llegan a diferenciarse, por lo que es necesario observar el crecimiento y volver a cortar el brote.

Una vez que las plantas hayan crecido lo suficiente el siguiente paso es trasplantarlas.

En primer lugar, se trasplantan a jiffy en unas bandejas con unas tapas de plástico transparente que hacen el papel de mini-invernadero con el objetivo de que se mantenga una alta humedad y temperatura de forma que las plántulas no sufran mucho en el cambio de medio rico en nutrientes y azúcares a tierra.

El sustrato que se empleará será una mezcla de tierra marca *Flower* y perlita en una proporción 3:1. La mezcla se realizará en una mezcladora tipo hormigonera; luego se llenarán los alveolos de los jiffys y se regará abundante. Se colocarán las etiquetas en los jiffys correspondientes a donde se han de colocar las plántulas.

Por otro lado se prepararán los Eppendorfs para tomar muestras de hoja de cada planta en el momento del trasplante. Se utilizarán Eppendorfs de 2 ml a los cuales se les añadirán tres bolitas de acero del microdesmembrador. Cada Eppendorf irá convenientemente etiquetado correspondiéndose con una planta de la bandeja de jiffys de modo que no habrá equivocación de qué Eppendorf representa a cada planta.

Teniendo todo preparado se procede al trasplante; se sacan las plantas de los botes y se plantan en los jiffys. Para ello se quitan las hojas más grandes y de la zona más basal de manera que tengan pocas hojas y preferentemente por la parte apical. Es conveniente este paso ya que las plántulas son todavía débiles y sus raíces no están todavía preparadas para absorber todos los nutrientes ya que siempre han tenido la facilidad de encontrarse en un medio acuoso y con fácil disponibilidad de elementos. A la vez que se trasplantan se toman muestras de hojas, las cuales se enrollan y se introducen en un Eppendorf para, posteriormente, analizar. Estos Eppendorfs se meten en nitrógeno líquido para que se congelen al instante y, si no se van a analizar al momento, se guardan en el congelador a -80 °C.

Una vez finalizado el trasplante, se guardan las bandejas de jiffys en un fitotrón. Las condiciones ambientales de este fitotrón son las siguientes: Fotoperíodo: 16 h. luz, 8 h. oscuridad. T^a día: 24°C, T^a noche: 20°C. Humedad relativa 70%.

3.2.8.- Extracción de ADN. Método CTAB.

En primer lugar y antes de extraer el ADN se debe machacar la muestra con un aparato llamado Microdesmembrador. Las muestras deben estar primero en nitrógeno líquido y en ningún momento se debe romper la cadena de frío pues podría dañarse el ADN, por lo que el recipiente donde se introducen los Eppendorfs para colocarlos en el Microdesmembrador deben bañarse en nitrógeno líquido cada vez que se vayan a machacar muestras nuevas. Las muestras se machacan y pulverizan gracias a las bolitas de acero que contiene el Eppendorf y, normalmente, es suficiente un minuto y medio en el

Microdesmembrador, marca Sartorius. Las muestras pulverizadas se devuelven al nitrógeno líquido y, si no se va a extraer su ADN en ese momento, se guardan en el congelador a -80°C.

La extracción de ADN es un paso previo necesario para poder analizar las muestras de hoja mediante PCR.

El protocolo para su extracción se detalla a continuación:

- Se añade a cada Eppendorf 400 microlitros de tampón CTAB precalentado a 60°C y se homogeneiza con Vortex. Es necesario calentar el CTAB ya que es un buffer muy denso.
- Se incuban a 60°C durante 30 minutos en el termomixer en agitación.
- En la campana de gases, se añade 400 microlitros de Cloroformo/Alcohol isoamílico (24:1). Se mezcla por inversión y se centrifuga 3 minutos a 14000 rpm.
- Se recoge el sobrenadante y se repite la extracción con Cloroformo/Isoamil. Se mezcla por inversión y se centrifuga 3 minutos a 14000 rpm.
- Se recoge el sobrenadante y se añade 0,7 volúmenes de Isopropanol frío (-20°C), unos 250 microlitros para menos de 400 microlitros recuperados. Se mezcla por inversión y se verá la hebra de ADN.
- Se deja 5 minutos a -20°C y luego se centrifuga 3 minutos a 14000 rpm. Mejor si son 5 minutos ya que en alguna ocasión puede desprenderse el pellet.
- Se seca el pellet boca abajo sobre papel absorbente.
- Se lava el pellet con 700 microlitros de EtOH 70% frío (-20°C). Se vortexea hasta que se desprege el pellet y así se lave y se centrifuga 3 minutos a 14000 rpm. Como en el caso anterior, mejor centrifugarlo 5 minutos para que el pellet quede bien sujeto.
- Se seca el pellet boca abajo sobre papel absorbente y se pone en el Termomixer a 42-55°C durante 3-5 minutos para que se seque bien.

- Se añaden 45 microlitros de agua MilliQ + 5 microlitros de RNAsa a cada Eppendorf y se incuban en el Termomixer en agitación durante 30 minutos a 37°C.

- Finalmente se guarda el ADN en el congelador a -20°C.

3.2.9.- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Los compuestos necesarios y sus cantidades se muestran a continuación:

- Buffer 10x: 2,5 microlitros
- MgCl₂: 1 microlitro
- *Cebador* Reverse: 0,75 microlitros
- *Cebador* Forward: 0,75 microlitros
- dNTPs: 0,5 microlitros
- TAQ: 0,4 microlitros
- ADN: 1 microlitro
- H₂O MilliQ: 18,1 microlitros

El procedimiento seguido es el siguiente:

En primer lugar se cogen los cebadores correspondientes (Tabla 3) y se diluyen 1:10.

El ADN también hay que diluirlo en una proporción 1:20 (2 microlitros de ADN y 38 microlitros de H₂O MilliQ).

Una vez tenemos el ADN y los cebadores diluidos, se prepara la mezcla o MIX con los compuestos arriba mencionados (excepto el ADN) y teniendo en cuenta la cantidad de muestras de ADN que vamos a analizar. 24 microlitros de esta MIX se añaden a tantos tubos de 200 microlitros como muestras se vayan a analizar. Una vez todos los Eppendorfs tengan la MIX se añadirá el microlitro de ADN.

Se trabajará siempre en hielo para evitar daños en los componentes.

Tabla 3: Cebadores utilizados en las PCR, su secuencia, fragmento que amplifican y tamaño de la secuencia amplificada.

Cebadores	Secuencia	Amplifican	Tamaño secuencia
RaadAVnew	5'- GAA TTC GTC GAC ACG CGT GGT ACC GAT ATC TTA TTT	aadA	795 pb
FaadAVnew	5'- GCG AAT TCT AGG GAG GCA ACC ATG GCT CGT GAA GCG		
NTTrxf	5'- CCA TGG GTC ACC ATC ACC ATC ACC ATA GCT CCG ATG CTA CTG	TRX	387 pb
NTTrxf3	5'- GCG GCC GCT TAA CTT GAC CGC ACA TCC TCA ATT G		
Cre1	5'- CAG GTG TGG CCA ATG TCC AAT TTA CTG ACC G-3'	CRE	1030 pb
Cre2	5'- GGG TCT AGA CTA ATC GCC ATC TTC CAG CAG-3'		

Las PCR se harán en un termociclador de marca Eppendorf.

Los ciclos de temperatura se muestran en las siguientes Figuras 7, 8, 9.

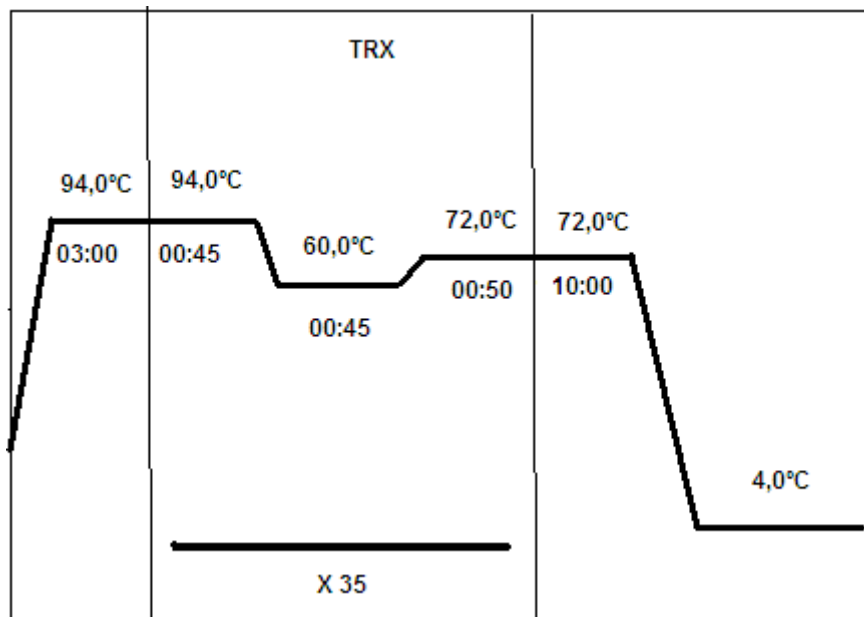


Figura 7: Ciclo de temperaturas de PCR para la tiorredoxina

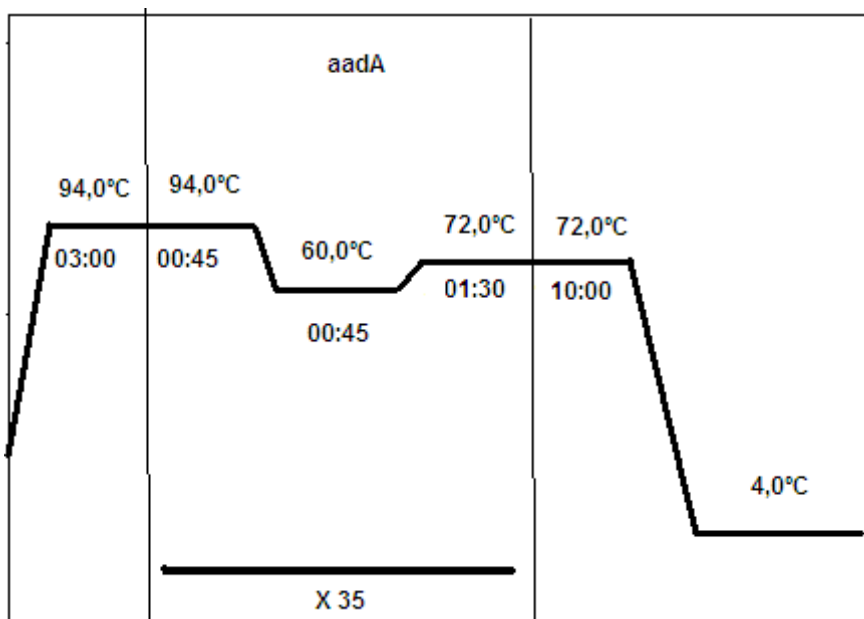


Figura 8: Ciclo de temperaturas de PCR para aadA

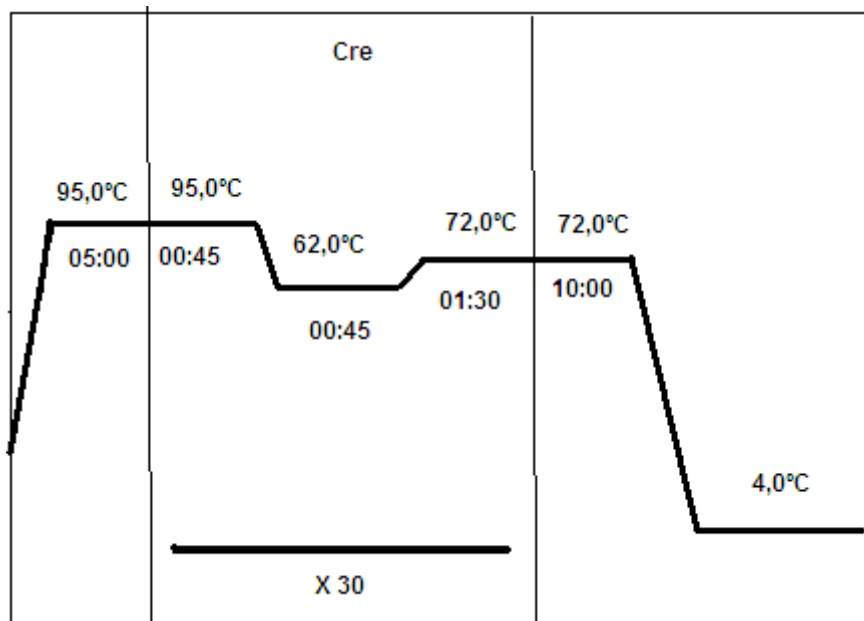


Figura 9: Temperaturas de PCR para comprobar si se ha incorporado el gen Cre al genoma

Al colocar los tubos de 200 microlitros en el termociclador se seleccionará el programa deseado (ya que se pueden variar los tiempos de cada temperatura).

Una vez se ha completado la PCR los tubos se guardan en el frigorífico del laboratorio

3.2.10.- Gel de agarosa y electroforesis

El siguiente paso es separar las muestras en un gel de agarosa.

En primer lugar se prepara la cubeta de electroforesis con el gel de agarosa, al cual se le añade bromuro de etidio antes de que gelifique y se pone el peine para formar los pocillos. La proporción es 5 microlitros de bromuro de etidio por cada 100 mililitros de agarosa.

El bromuro de etidio es una sustancia que se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Es fotosensible y posiblemente mutagénico.

Mientras se espera que gelifique se va haciendo el siguiente paso, que es añadir 5 microlitros de glicerol a cada Eppendorf, succionando y vertiendo varias veces para que el glicerol dé peso a toda la muestra.

Cuando la agarosa ya ha gelificado, se pone en el equipo de electroforesis y se cubre bien con TAE 1x llenando todos los pocillos.

En cada fila de pocillos se pondrá 5 microlitros de muestra de peso molecular conocido *HyperLadder I* y en el resto de los pocillos se pondrán 20 microlitros de muestra de ADN a analizar.

Se pone corriente a 80 V y se deja correr.

Se utiliza una concentración de agarosa al 0,8%.

Una vez que las muestras han corrido, el gel se llevará al Chemi Doc de marca Syngene G-Box, donde se iluminará con luz ultravioleta y se tomará una foto de las bandas.

El tamaño esperado de las bandas en el caso que se encuentre presente el gen marcador de selección *aadA*, es de 795 pb.

En el caso de que se haya eliminado este gen no se formará banda.

Protocolo para la preparación de agarosa al 0,8%

- Se coge 1 litro de TAE 1x para disolver la agarosa.
- Se pesan 8 gramos de agarosa y se van echando poco a poco al TAE, de forma que no queden grumos.
- Se mete al microondas y se va sacando cada poco tiempo para ir removiéndolo.
- Se deja hervir aproximadamente 6 veces, sacándolo cada vez y removiéndolo.
- Se rellena la botella de agarosa y se devuelve a la estufa.

3.2.11.- Trasplante y prueba de espectinomicina

Las muestras de hoja que den como resultado en la PCR la ausencia de banda de 795 pb serán las posibles plantas que hayan perdido el gen marcador de selección *aadA* y, por tanto, son las que interesan para este trabajo.

De esta manera, se trasplantarán a maceta y se mantendrán en el fitotrón 1, con la misma temperatura, fotoperiodo y humedad. Cuando se hayan desarrollado lo suficiente se trasladarán a un invernadero. En este trabajo se

dispone de dos invernaderos con las siguientes condiciones ambientales en cada uno de ellos:

- Invernadero 1: Fotoperíodo: 14.5 h. luz 9.5 h. oscuridad. T^a día: mín. 23°C Máx. 29°C, T^a noche: mín. 17°C Máx. 24°C. Humedad relativa 50%-70%.
- Invernadero 2: Fotoperíodo: 14.5 h. luz 9.5 h. oscuridad. T^a día: mín. 25°C Máx. 29.5°C. T^a noche: mín. 20°C Máx. 24°C. Humedad relativa 50%-70%

El resto de plantas que hayan dado la banda de 795 pb son las que habrá que descartar y, por tanto, se eliminarán autoclavándolas.

A estas plantas se les hará una prueba que consistirá en poner explantos de estas hojas en un medio que contenga espectinomicina ya que el gen de selección confiere resistencia a este antibiótico y, si se ha logrado eliminar este gen, los explantos blanquearán.

Las hojas que se vayan a colocar en el medio necesitarán ser desinfectadas para evitar cualquier contaminación por agentes patógenos.

Protocolo para la desinfección de hojas de tabaco.

- Coger hoja sana, joven, preferentemente de la zona apical
- Meter la hoja en un vaso de precipitados con, aproximadamente, 150 ml de etanol al 70%. Mantener 1 minuto.
- Después de 1 minuto, se le quita el etanol y se le añade lejía diluida en una proporción 1:4. Se añaden aproximadamente 300 ml y se mantiene en agitación durante 5 minutos
- En la cabina de flujo laminar se hacen 3 lavados con agua estéril.
- Se procede a cortar explantos de hoja y se colocan en medio P3 + Espectinomicina

3.2.12.- Southern Blot

Esta técnica tiene 5 pasos:

1) Digestión del ADN.

En primer lugar se realizó la cuantificación del ADN. Posteriormente se procedió a la digestión mediante la enzima BglII. que, además de digerir el ADN, da un patrón diferente en la planta transformada y la que está sin transformar. La digestión del ADN se hizo añadiendo 2µl de la enzima, 3µl de Buffer 10x y se llevó a 30µl con agua purificada y se situó en un gel de agarosa.

2) Desnaturalización del ADN

Tras la separación de los fragmentos por tamaño se realizó la desnaturalización del ADN en el gel de agarosa. Consiste en realizar una serie de pasos intermedios:

- Depuración (quitar las purinas para fragmentar el ADN y facilitar su transferencia a la membrana).

Se sumerge el gel bocabajo en una solución 0,2N HCl y se incuba 10'. Luego se lava 5' con H₂O desionizada.

- Desnaturalización (que consiste en pasar de doble cadena a cadena simple y así poderse unir a la sonda).

Se incuba 45' con la solución de desnaturalización (1,5M NaCl, 0,5M NaOH) y se lava 5' con H₂O desionizada.

- Neutralización.

Se incuba 30' en la solución de neutralización (1M tris HCl pH 7.4, 1.5M NaCl). Después se cambia la solución y se incuba durante 15' más.

3) Transferencia: paso del ADN del gel a una membrana de nylon

Para realizar este paso se incuba el gel en la solución de transferencia (20x SSC) durante 10' mientras que en otra cubeta se va hidratando la membrana con H₂O. Se necesita a continuación un montaje para el que se necesita la cubeta grande de geles, un paquete de servilletas, papeles Whatman, una membrana

de 15 x 14, una varilla de cristal para eliminar burbujas, una bandeja de genes grande y la solución de transferencia.

Con este montaje lo que se consigue es que el ADN del gel de agarosa pase a la membrana. Las servilletas tienen la función de ir absorbiendo la solución y que de esta manera el ADN suba hasta la membrana, a la cual se quedará adherido.



Figura 10: Montaje para la transferencia del ADN desde el gel hasta la membrana

Este montaje se deja hasta el día siguiente. Al desmontarlo se marcó la zona en la que la membrana quedó pegada a los pocillos de gel para tomarla como referencia.

Se coge la membrana sobre papel de aluminio y se fija mediante UV utilizando el Stratalinker. Para guardar la membrana se sitúo entre dos papeles de filtro en una bolsa de plástico a -20°C y en oscuridad.

4) Hibridación de la membrana

Para realizar este paso se utilizó un horno de hibridación (mini-oven, Hybaid). La membrana se introduce enrollada en un tubo con el ADN hacia el interior. Primero se prehibrida la membrana 4 horas en agitación suave con 20 ml del tampón de hibridación Dig EasyHyb a 42°C. Después se añade 15 ml del

buffer de hibridación+sonda y se deja hasta el día siguiente girando en la mini-oven a 42°C.

5) Lavado de la membrana

En primer lugar se realizan dos lavados de 5 minutos cada uno con 250 ml por lavado de SSC 0,1% SDS en una cubeta en agitación a temperatura ambiente.

Después le siguen dos lavados de 15 minutos cada uno con 100 ml por lavado de 0,5X SSC 0,1% SDS girando en la mini-oven a 68°C.

A continuación, se lava con 100 ml de tampón de lavado y se deja 5 minutos agitando en bandeja a temperatura ambiente. Posteriormente se bloquea 45 minutos en 100 ml de solución de bloqueo en agitación a temperatura ambiente.

Seguidamente, se incuba entre 30 y 60 minutos en 25 ml de tampón anticuerpo agitando en bandeja a temperatura ambiente.

Se realizan dos lavados de 15 minutos cada uno con 50 ml de tampón de lavado en agitación en bandeja a temperatura ambiente.

A continuación se deja entre 2 y 5 minutos en 20 ml de tampón de detección.

Se coloca la membrana en un plástico con el ADN hacia arriba y se echa 1 ml de la solución 5 (CSPD) y se deja 5 minutos a temperatura ambiente.

Se incuba 10 minutos a 37°C y finalmente se expone de 15 a 30 minutos y se revela.

4.- Resultados y discusión

4.1.- Regeneración de plantas tras el proceso de agroinfiltración

De cada fragmento de hoja que se agroinfiltró, se individualizaron 2 brotes emergentes, resultado de la organogénesis que tuvo lugar al colocarlos en el medio RMOP.

El total de los brotes individualizados fue de 309, siendo 194 de la variedad 503-B y 115 de la variedad Virginia Gold. En la Tabla 4 se muestran los regenerantes obtenidos de cada condición.

El número de plántulas de la variedad Vir es menor debido a que cuando se colocaron en el medio RMOP donde tuvo lugar la organogénesis, los callos y los brotes que emergieron eran blanquecinos y pocos brotes eran de un color verde por lo que se individualizaron menos.

Dentro de cada variedad no se observó efecto alguno de los tratamientos sobre el número de brotes regenerados por organogénesis (Tabla 4).

Tabla 4: Número de regenerantes que se obtuvieron de cada variedad de cada una de las 4 condiciones, siendo la condición 1: 2 Torr, 2 días; condición 2: 2 Torr, 4 días; condición 3: 10 Torr, 2 días; condición 4: 10 Torr, 4 días

Condición	Nº Regenerantes 503-B	Nº Regenerantes Vir
1	43	29
2	59	32
3	45	28
4	47	26

Las plántulas se trasplantaron a maceta y se desarrollaron con normalidad hasta la floración (Figura 11). Todas estas plantas se analizaron mediante la técnica de PCR, las positivas se confirmaron mediante Southern blot y se observó su sensibilidad/resistencia a espectinomicina.



Figura 11: Plantas desarrollándose en el invernadero

4.2.- Chequeo de la presencia del gen *aadA* mediante PCR

Se analizaron por PCR el total de las plantas obtenidas, utilizando como cebadores los correspondientes al *aadA* de manera que den una banda en el gel en presencia del gen y la ausencia de banda cuando el gen no esté presente.

- Variedad 503-B

Se hicieron cuatro tandas de PCR para la variedad 503-B, incluyéndose en ellas un control negativo y uno positivo. Los geles de agarosa muestran que casi todas las muestras son portadoras del gen *aadA*, sin embargo, en todas las tandas aparecen algunas muestras sin banda, lo que se corresponde con plantas que posiblemente hayan perdido el gen *aadA*.

En la Tabla 5 se representa el número de muestras sin banda que resultan en cada una de las condiciones respecto al total de las plantas analizadas.

Tabla 5: Resultado del análisis por PCR del gen *aadA* de las plántulas de la variedad 503B.

Condición	Nº Plantas analizadas	Nº Muestras sin banda del gen <i>aadA</i>	% sin banda
1	43	2	4,65%
2	59	3	5,08%
3	45	1	2,22%
4	47	2	4,25%
Total	194	8	4,12%

Así pues, el total de las muestras analizadas es de 194 obteniéndose un resultado de 8 muestras que no presentan la banda correspondiente al gen *aadA*. La eficiencia total sería de un 4,12% de plantas que no han presentado banda y, por tanto, pueden haber perdido el gen marcador de selección. Los resultados son similares en los 4 tratamientos.

En la Figura 12 se muestran unas fotografías representativas de los resultados obtenidos en todas las PCR realizadas. Incluye como control positivo (C+) una planta transformada pero sin haber sido sometida a agroinfiltración. Además, se puede observar también el control negativo, de una planta de la variedad Petite Havana (PH-), sin transformar, y que, por tanto, no tiene ni el gen de la tiorredoxina ni el del *aadA*, a diferencia del resto de plantas con las que se ha trabajado. Se observa que una de las muestras no tiene la banda del gen *aadA* y que, por tanto, es posible que haya perdido este gen, lo cual se confirmará mediante Southern blot.

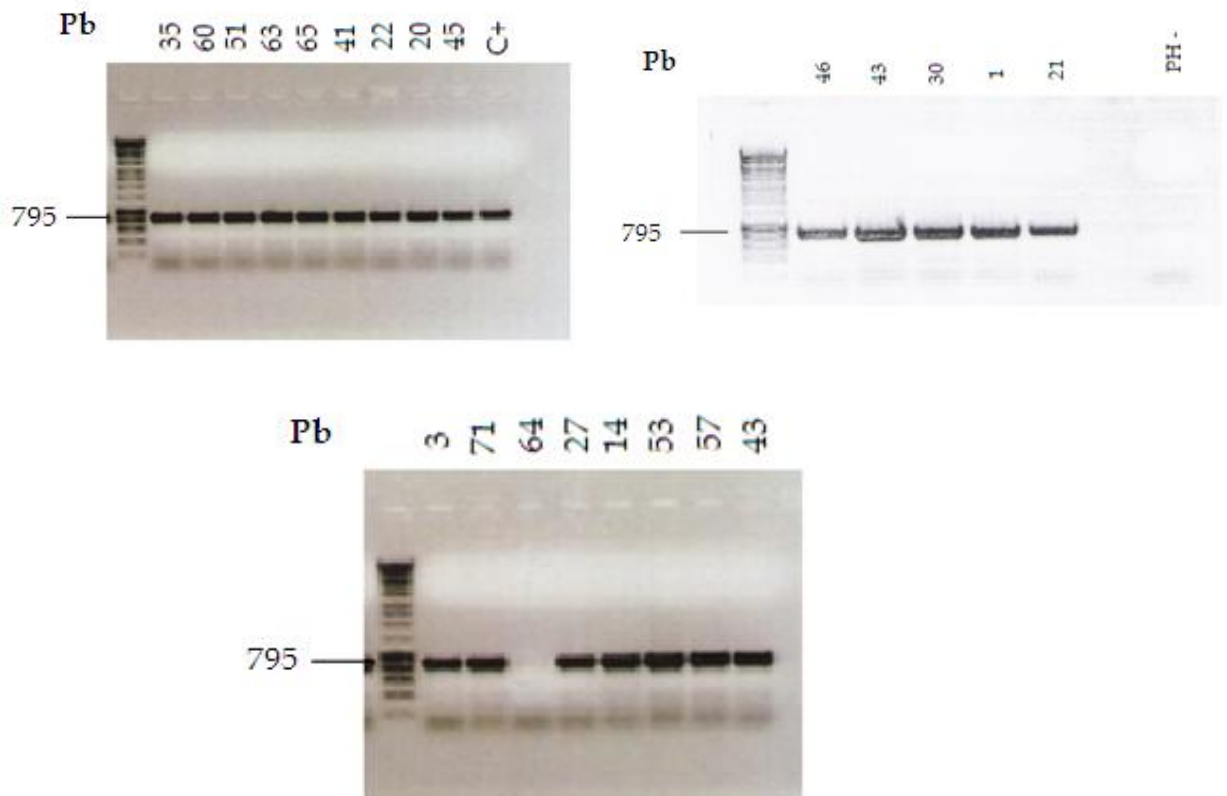


Figura 12: Resultado de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Los números indican las diferentes plantas analizadas. Se ha incluido también un control negativo (PH-) de una planta sin transformar, de la variedad Petit Havana, que no incluye en su genoma plastidial el gen *aadA*. Incluye también un control positivo (C+: planta transplastónica que lleva el gen *aadA*). Pb: pares de bases.

- Variedad Virginia Gold

Se hicieron cuatro tandas de PCR para la variedad Virginia Gold, incluyéndose en ellas un control negativo y uno positivo. Los gels de agarosa muestran que casi todas las muestras son portadoras del gen *aadA*, sin embargo, en todas las tandas aparecen algunas muestras sin banda, lo que se corresponde con plantas que posiblemente hayan perdido el gen *aadA*.

En la Tabla 6 se representa el número de muestras sin banda que resultan en cada una de las tandas de PCR.

Tabla 6: Resultado del análisis por PCR del gen *aadA* de las plántulas de la variedad *Virginia Gold*.

Condición	Nº Plantas analizadas	Nº Muestras sin banda	% sin banda
1	29	1	3,45%
2	32	1	3,125%
3	28	3	10,71%
4	26	1	3,85%
Total	115	6	5,22%

Así pues, el número de plantas analizadas de la variedad Vir es de 115 y el número de muestras que no dieron banda es de 6, siendo el porcentaje de 5,21%.

El porcentaje de plantas que no dieron banda es superior en la variedad Virginia Gold en comparación con la 503-B, siendo casi de un 1% más. En cualquier caso, presentan un porcentaje muy similar aunque, sin embargo, son aproximadamente la mitad del porcentaje que obtuvieron Maliga et al (2006), siendo éste del 10%.

En la Figura 13 se muestra un ejemplo representativo de los resultados obtenidos por PCR en la variedad Virginia Gold. Se incluye un control positivo (C+) de una planta sin agroinfiltrar y un control negativo correspondiente a una planta de la variedad Petit Havana sin transformar. Se observa una muestra que no presenta banda correspondiente al gen *aadA* lo que puede corresponderse con una planta que haya perdido este gen y que, posteriormente, se comprobará mediante Southern blot.

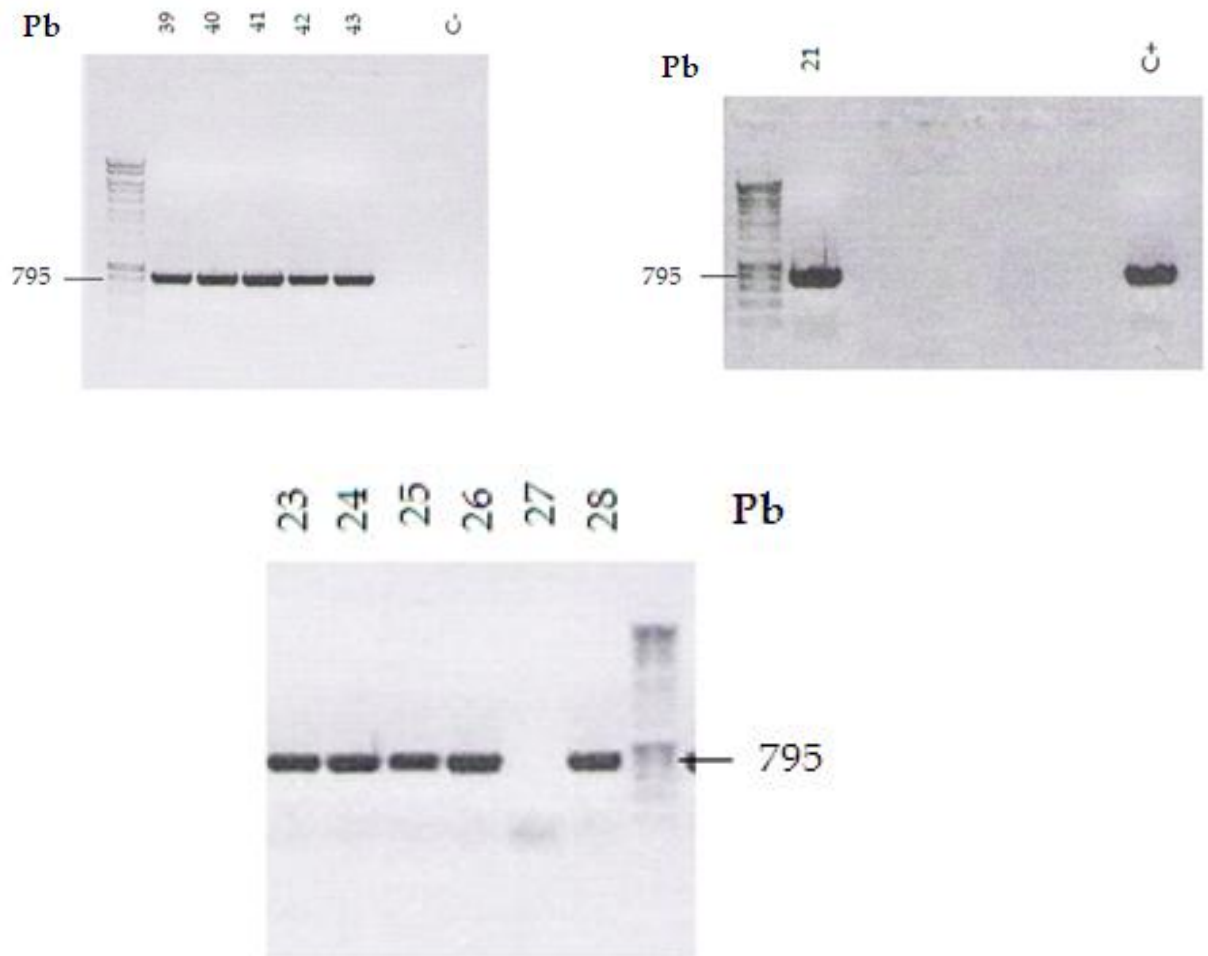


Figura 13: Resultado de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Los números indican las diferentes plantas analizadas. Se observa también una muestra sin banda (nº27), la cual se corresponde con una planta que posiblemente haya perdido el gen *aadA*. Control positivo (C+: planta transplastómica que lleva el *aadA*) con banda de 795 Pb y control negativo (C-: planta sin transformar) sin banda. Pb: pares de bases.

Tras analizar las 309 plantas por PCR, 14 de ellas no presentaban banda por lo que estas son las que posiblemente hubiesen perdido el gen *aadA*.

Se hizo entonces una nueva PCR con los cebadores correspondientes a la *tiorredoxina* para comprobar que estas plantas no habían perdido este gen al introducir la CRE y que solo habían perdido el *aadA* (Figura 14).

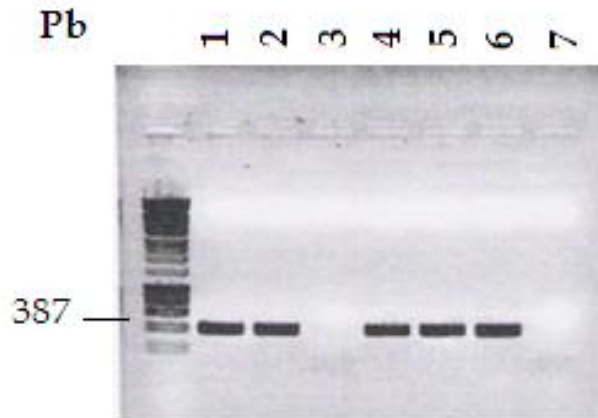


Figura 14: Gel de agarosa resultado de la PCR para comprobar la presencia del gen *tioredoxina* (387 pb) en las muestras de plantas que han dado negativo en la PCR del gen *aadA*.

Se obtiene que 10 de las muestras analizadas presentan la banda correspondiente a la *tioredoxina*, confirmándose que no se ha perdido en el proceso pero, sin embargo, 4 de las muestras no presentan banda y, aunque no se sabe bien por qué esto es así, tres son las hipótesis que se plantean: por un lado puede haberse producido una recombinación que haya suprimido el gen de la *tioredoxina*, por otro lado puede haber habido algún contaminante que haya inhibido la reacción de la polimerasa o puede ser que no se haya cogido bien el ADN para realizar la PCR.

De las 14 plantas negativas para el *aadA* finalmente quedaron 13 ya que una de ellas murió durante el trasplante.

Por otra parte se comprobó mediante una nueva PCR que la recombinasa CRE no se había incorporado al núcleo de ninguna de las plantas (Figura 15). Aunque nuestro objetivo era conseguir que la recombinasa CRE se expresase de forma transitoria y no se incorporase al núcleo, y de hecho los métodos empleados son para ello, resulta conveniente comprobar que no se ha integrado al núcleo celular en ninguno de los casos puesto que de ser así habría que esperar a eliminarla mediante reproducción sexual en la descendencia.

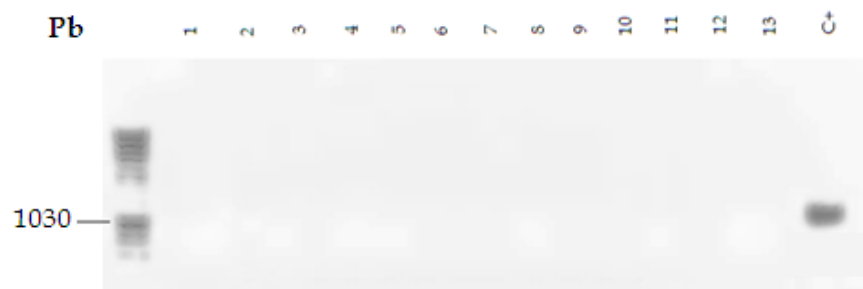


Figura 15: Gel de agarosa para determinar si se ha incorporado al núcleo celular la recombinasa CRE (1030 pb). Control positivo a la derecha.

Esta PCR confirmó que ninguna de las plantas ha incorporado el gen *cre* al núcleo celular, como era de esperar. Se incluyó en esta prueba, también, un control positivo del plásmido que lleva el gen *cre* para comprobar que la PCR estaba saliendo correctamente.

Por tanto, se puede decir que, con la prueba de PCR se seleccionaron 13 plantas que posiblemente hubiesen perdido el gen marcador de selección *aadA*. Se comprobó que la mayoría mantenía la *tiorredoxina* y además, que la CRE no se había integrado en el núcleo. En la Tabla 7 se presentan los códigos de estas 13 plantas y se observa que provienen, aproximadamente por igual, de las 4 condiciones de agroinfiltración y cocultivo.

Tabla 7: Plantas negativas para el *aadA* en la PCR. El primer número se corresponde con la condición de agroinfiltración, el segundo con el número de experimento y el tercero con el número de planta

503-B	VIR
1-1-15	2-1-27
1-3-34	2-2-21
2-2-6	3-1-6
2-3-67	3-2-13
3-3-20	3-2-27
4-2-1	4-2-10
4-2-10	

4.3.- Sensibilidad a espectinomicina de las plantas trasplantadas

El poner explantos de hoja en un medio que contiene espectinomicina aporta información visual sobre la presencia o ausencia del gen marcador de selección *aadA*. Las plantas que hayan eliminado el gen marcador serán sensibles al antibiótico y, por tanto, blanquearán cuando se pongan en contacto con la espectinomicina. En cambio, las plantas que todavía tengan incorporado este gen, serán resistentes al antibiótico y presentarán su fenotipo normal, manteniendo el color verde.

No todas las plantas que dieron positivas en la PCR han blanqueado. De las 14 plantas que no tenían banda en el gel de agarosa resultado de la PCR, solamente 6 han mostrado sensibilidad al antibiótico.

Las plantas que han blanqueado son las mostradas en la Tabla 8:

***Tabla 8:** Plantas sensibles a espectinomicina. El primer número se corresponde con la condición de Agroinfiltración, el segundo con el número de experimento y el tercero con el número de planta*

503 B	VIR
1-3-34	2-2-21
3-3-20	3-2-13
4-2-10	4-2-10

En la Figura 16 se muestra la comparación de los explantos blanquecinos (sensibilidad a espectinomicina) y los explantos de un color verde característico (resistencia a espectinomicina). Las plantas que presentan sensibilidad a espectinomicina son las que se han regenerado en este trabajo ya que es posible que hayan perdido el gen *aadA* que confiere resistencia al antibiótico espectinomicina.



Figura 16: Comparación de explantos verdes y explantos blancos en un medio de cultivo que contiene espectinomicina. (1) Resistente a espectinomicina; (2) Sensible a espectinomicina.

4.4.- Southern blot de las plantas PCR negativo para el gen *aadA*.

Se realizó un Southern blot de las plantas que habían dado negativo en las PCR. Esta prueba confirmaría si el gen marcador de selección *aadA* se había conseguido eliminar del plastoma o no.

En la Figura 17 se muestra la fotografía del gel de agarosa tras la digestión del ADN con la enzima de restricción *BglIII*. Como se observa, las muestras están muy desiguales en cantidad de ADN. En algunas de ellas había tan poca cantidad de ADN que se cargó todo lo que se pudo e incluso, en algunas muestras, no se observa nada de ADN.

PH Vir M 503 Vir 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 503

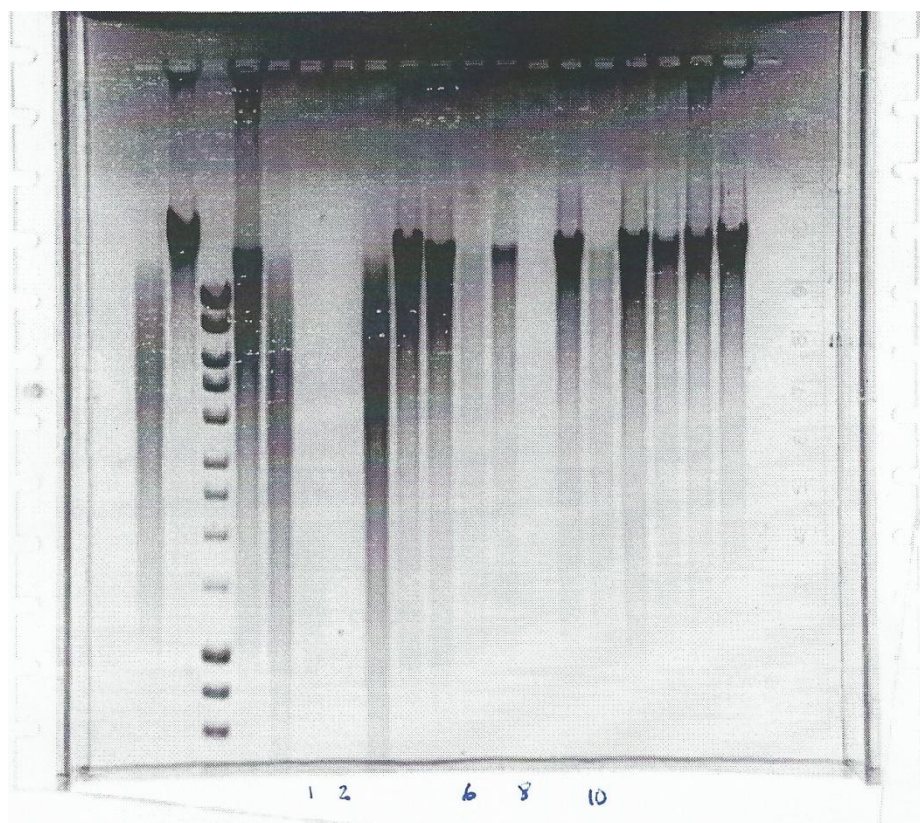


Figura 17: Gel de agarosa del ADN total de las plantas regeneradas (1-13), digerido con BglIII. En rojo los controles negativos sin transformar, en azul los controles de plantas transformadas de partida (con el *aadA*).

Aunque la cantidad de ADN es muy desigual e, incluso, algunas muestras no tienen suficiente cantidad para que se observe en la digestión, se continuó con el Southern blot.

En primer lugar se hibridó con la sonda correspondiente a las regiones flanqueantes (Figura 18).

Las muestras con *aadA* deben dar un tamaño de banda de 6,253 kb.

Las muestras sin *aadA* deben dar un tamaño de banda de 4,474 kb.

Se observa que los controles de plantas sin transformar no han digerido bien y no sale la banda esperada de 4,474 kb. En el resto de muestras sale la banda correspondiente a la presencia del *aadA* de 6,253 kb, también en los controles positivos. Las calles que no tienen banda o ésta es muy tenue se corresponde con las muestras que tenían poca cantidad de ADN.

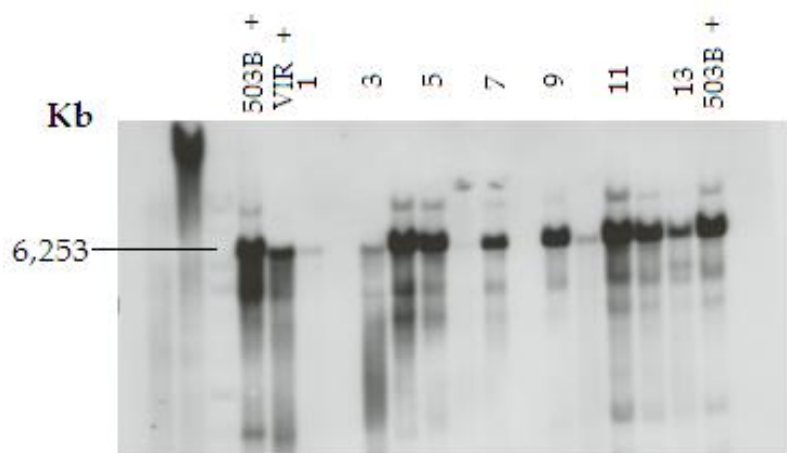


Figura 18: Análisis por Southern blot de 13 plantas PCR- para el gen *aadA* usando la sonda SH (Regiones flanqueantes). Controles positivos 503B+ y VIR+. Las muestras presentan un tamaño de banda de 6,253 kb; las muestras que no presentan banda se corresponden con las que tenían poco ADN en la digestión.

Se realizó un nuevo Southern blot con otra sonda, esta vez la correspondiente al *aadA* de forma específica, de forma que aparecerá banda únicamente en los casos que sí contengan este gen (Figura 19). Se ve que todas las muestras presentan la banda correspondiente al *aadA* y las que no presentan banda se corresponden con las que tenían poco ADN.

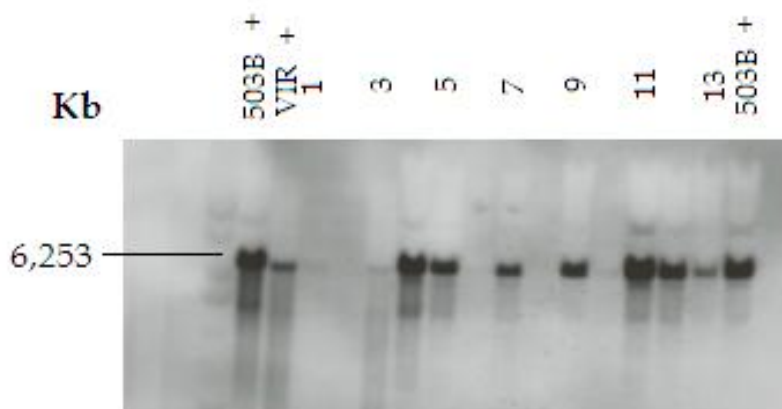


Figura 19: Análisis por Southern blot de 13 plantas PCR- para el gen *aadA* usando la sonda *aadA*. Los controles positivos son los 503B+ y VIR+, confirmando que presentan la banda de 6,253kb esperada. Las muestras presentan banda de dicho tamaño; las que no la presentan se corresponden con las muestras que contenían poco ADN en la digestión.

Tanto el Southern Blot realizado con la sonda correspondiente a las regiones flanqueantes como el realizado con la sonda correspondiente al *aadA* han mostrado el mismo resultado y es que las plantas son portadoras del gen

marcador de selección *aadA*. Este resultado es más concluyente que el de la PCR en la que puede haber artefactos que afecten al resultado.

Este resultado final no se corresponde con los obtenidos mediante PCR y la prueba del antibiótico espectinomicina. Las plantas con resultado negativo en la PCR para el gen *aadA* se pusieron en un medio que contenía espectinomicina y la mayoría de ellas blanquearon como cabría esperar si hubiesen perdido el gen marcador de selección, pues serían sensibles, entonces, a dicho antibiótico. Por tanto, el resultado obtenido a través del Southern Blot no es el esperado teniendo en cuenta las otras dos pruebas realizadas.

En cuanto a las PCR se puede decir que es probable que, para las muestras que han dado negativo, la cantidad que se cogió de ADN era insuficiente y por tanto no mostró banda. Hay que recordar que no se cuantificó la cantidad de ADN y que siempre se cargaba en la reacción de PCR 1 µl de la extracción. Por otro lado puede haber ocurrido que en dichas muestras hubiese algún tipo de contaminante que hubiese inhibido la reacción de la polimerasa.

En cambio, para el blanqueamiento de los explantos en contacto con la espectinomicina no se encuentra explicación razonable.

Por último se realizó una nueva PCR con los cebadores del *aadA* que en las anteriores había dado positivo, y todas ellas salieron portadoras del gen marcador (datos no mostrados).

Una de las hipótesis que se plantean es que los brotes individualizados fruto de la organogénesis hayan sido precisamente desarrollados a partir de una célula que no haya incorporado la recombinasa CRE o que no se haya dado la recombinación ya que los brotes emergentes eran muchos y, es posible que no todas las células hayan sufrido la recombinación. Por otra parte se descarta la posibilidad de que la célula de la cual se ha desarrollado un brote por sucesivas mitosis sea portadora de dos tipos de genoma plastidial (unos con el *aadA* y otros sin éste) ya que entonces se hubiesen formado dos bandas en el gel de agarosa del Southern Blot correspondientes a los dos tamaños de genoma plastidial.

5.- Conclusiones

1. Se ha puesto a punto la agroinfiltración de explantos de hoja de tabaco para la expresión transitoria de la recombinasa CRE.
2. No se han observado diferencias en el proceso de organogénesis entre los 4 tratamientos (2 presiones de vacío en la agroinfiltración y 2 tiempos de cocultivo).
3. La agroinfiltración de plantas transplastómicas de las variedades Virginia Gold y Havana 503-B para eliminar el gen *aadA* no ha sido eficiente. Tras analizar 309 plantas regeneradas, ninguna de ellas perdió el gen marcador.

.

6.- Bibliografía

- **Abremski, K., Hoess, R., Sternberg, N.**, 1983, *Studies on the properties of P1 site-specific recombination: Evidence for topologically unlinked products following recombination*. Cell, 32, 4, 1301-1311.
- **Barone, P., Zhang, X.H., Widholm, J.M.** 2009, *Tobacco plastid transformation using the feedbackinsensitive anthranilate synthase [a]-subunit of tobacco (ASA2) as a new selectable marker*. Journal of Experimental Botany, 6, 11, 3195-3202.
- **Bateman, J.M., Purton, S.** 2000, *Tools for chloroplast transformation in Chlamydomonas :expression vectors and a new dominant selectable marker*. Mol Gen Genet 263, 404-410.
- **Birky, C. William, Jr.** 2001, *The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, mechanisms, and models*. Annu. Rev. Genet. 35:125-148.
- **Bock, R.** 2001, *Transgenic Plastids in Basic Research and Plant Biotechnology*. J. Mol. Biol, 323, 425-438.
- **Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., Shark, K.B.** 1988, *Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles*. Science, 240, 4858, 1534-1538.
- **Corneille, S., Lutz, K., Svab, Z., Maliga, P.** 2001, *Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system*. Plant Journal, 27, 2, 171-178.
- **Dufourmantel, N., Dubald, M., Matringe, M., Canard, H., Garcon, F., Job, C., Kay, E., Wisniewski, J.P., Ferullo, J.M., Pelissier, B., Sailland, A., Tissot, G.** 2007, *Generation and characterization of soybean and markerfree tobacco plastid transformants over-expressing a bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase which provides strong herbicide tolerance*. Plant Biotechnology Journal, 5, 118-133.

- **Goldschmidt-Clermont, M.** 1991, *Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of chlamydomonas*. Nucleic Acids Res, 11; 19(15): 4083–4089.
- **Huang, F.C., Klaus, S., Herz, S., Zou, Z., Koop, H.U., Golds, T.** 2002, *Efficient plastid transformation in tobacco using the aphA-6 gene and kanamycin selection*. Mol Genet Genomics 268, 19–27.
- **Iamtham, S., Day, A.** 2000, *Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids*. Nature Biotechnology, 18, 1172.
- **Johansen, L.K. and Carrington, J.C.** 2001, *Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system*. Plant Physiol, 126, 930-938.
- **Kirk, J.T.O., Tilney-Bassett, R.A.E.** 1967, *The plastids; their chemistry, structure, growth, and inheritance*.
- **Klaus, S. M. J., Huang, F., Eibl, C., Koop, H., Golds, T. J.** 2003, *Rapid and proven production of transplastomic tobacco plants by restoration of pigmentation and photosynthesis*. The Plant Journal, 35, 811-821.
- **Kittiwongwattana, C., Lutz, K., Clark, M., Maliga, P.** 2007, *Plastid marker gene excision by the phiC31 phage site-specific recombinase*. Plant Molecular Biology, 64, 1-2, 137-143.
- **Li, Weimin., Ruf, S., Bock, R.** 2010, *Chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker for plastid transformation*. Plant Mol Biol.
- **Lutz, K. A., Bosacchi, M. H., Maliga, P.** 2006, *Plastid marker-gene excision by transiently expressed CRE recombinase*. The Plant Journal, 45, 447-456.
- **Maliga, P., Lutz, K., Bosacchi, M.** 2006, *Plastid marker-gene excision by transiently expressed CRE recombinase*. The Plant Journal, 45, 447-456.
- **Maliga, P., Svab, Z.** 1991, *Mutation proximal to the tRNA binding region of the Nicotiana plastid 16S rRNA confers resistance to spectinomycin*. Mol Gen Genet, 228, 316-319
- **Margulis, Lynn.** 1967, *On the origin of mitosing cells*. Journal of Theoretical Biology, 14, No. 3.

- **Moll, B., Polsby, L., Maliga, P.** 1990, *Streptomycin and lincomycin resistances are selective plastid markers in cultured Nicotiana cells.* Mol Gen Genet, 221, 245-250.
- **Oey, M., Lohse, M., Kreikemeyer, B., Bock, R.** 2009, *Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic.* The Plant Journal (2009) 57, 436–445.
- **O'Neill, C., Horvath, G.V., Horvath, E., Dix, P.J., Medgyesy, P.** 1993, *Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems.* The Plant Journal 3, 5, 729-738.
- **Potrikus, I., Karesch, H., Bilang, R., Scheid, O.M.** 1991, *Direct gene transfer to protoplasts of Arabidopsis thaliana.* Plant Cell Reports, 9, 571-574
- **Ruiz, P., Rodríguez-Cano, F., Zerolo, F.J., Casal, M.** 2003, *La estreptomicina como fármaco de segunda línea en la quimioterapia de la tuberculosis.* Rev Esp Quimioterap, 16, 2, 188-194.
- **Sanford, J.C., Devit, M.J., Russell, J.A., Smith, F.D., Harpending, P.R., Roy, M.K., Johnston, S.A.** 1991, *An improved, helium-driven biolistic device.* A journal of methods in cell and molecular biology, Vol 3, No 1, 3-16.
- **Sauer, B.** 1998 *Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/lox System.* A Companion to Methods in Enzymology 14, 381–392.
- **Song, H.E., Brotherton, J.E., Gonzales, R.A., Wildholm, J.M.** 1998, *Tissue Culture-Specific Expression of a Naturally Occurring Tobacco Feedback-Insensitive Anthranilate Synthase.* Plant Physiol. 1998 June; 117(2), 533–543.
- **Svab, Z., Hajdukiewicz, P., Maliga, P.** 1990. *Stable transformation of plastids in higher plants.* National Acad Sciences, 87, 8526-8530
- **Svab, Z., and Maliga, P.** 1993, *High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a quimeric aadA gene.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 913-917.
- **Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D.** 2003, *An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein from tomato bushy stunt virus.* Plant Journal, 33, 949-956.

- **Ye, GN., Colburn, S. M., Xu, C. W., Peter T. J. Hajdukiewicz, and Staub, J. M.** 2003, *Persistence of Unselected Transgenic DNA during a Plastid Transformation and Segregation Approach to Herbicide Resistance*. *Plant Physiology*, 133, 402-410.
- **Wakasugi, T., Sugita, M., Tsudzuki, T., Sugiura, M.** 1998, *Updated Gene Map of Tobacco Chloroplast DNA*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16, 231-241.